



UNIVERSIDAD ESTATAL

PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

**“ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN
DE POBLACIONES BACTERIANAS EN SISTEMAS DE
ENGORDE DE CAMARÓN DURANTE UN CICLO DE
CULTIVO.”**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

YESSENIA SOLANGE POZO QUIMIS

LA LIBERTAD – ECUADOR

2006

UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

“ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN
DE POBLACIONES BACTERIANAS EN SISTEMAS DE
ENGORDE DE CAMARÓN DURANTE UN CICLO DE
CULTIVO.”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

YESSENIA SOLANGE POZO QUIMIS

LA LIBERTAD – ECUADOR

2006

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y resultados expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, es compartido FUNDACIÓN CENAIM – ESPOL con la UNIVERSIDAD PENÍNSULA DE SANTA ELENA-UPSE.”

Yessenia Solange Pozo Quimis
C.I. 091867046-4

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres: Pedro y Salomé y a mi bisabuela Simona. Aunque a veces pensé que les fallaba, siempre estuvieron ahí conmigo.

AGRADECIMIENTO

A las autoridades y personal Académico de la Universidad Estatal Península de Santa Elena por liderar el proceso de formación profesional.

A Dios por permitirme hacer realidad uno de mis anhelados sueños.

A mis padres y hermanos por haberme brindado toda su confianza, amor, paciencia y por los grandes valores inculcados para guiarme por el camino correcto. Gracias por haberme dado el privilegio de culminar mi carrera.

Al Dr. Jorge Calderón, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis y a todos los que confirman la familia CENAIM.

A mi director de tesis Ac. MsC Ricardo Cedeño Campuzano por ayudarme y estar pendiente en el desarrollo de este trabajo para terminarlo, aportando siempre dedicación y responsabilidad. Gracias por tenerme paciencia, y depositarme su confianza.

Al M.Sc. Enrique Blacio quién me dio la oportunidad de ingresar a esa institución y de esta forma hacer realidad una de mis más anheladas metas en mi vida profesional.

Al Sr. Álvaro Bonaguero administrador de la Camaronera OPUMARSA, por permitirnos recolectar muestras que fueron indispensables para este trabajo. A María Auxiliadora Sotomayor y Rosa Malavé por permitirme ingresar en el Laboratorio de Microbiología y enseñarme todo lo que debía hacer para poder obtener los resultados esperados de mi tesis.

Al Acuicultor José Melena, por su gran ayuda y apoyo brindado gracias por su amistad incondicional. A mi y gran amiga Martha Borbor a quién en este tiempo aprendí a conocerla y apreciarla por todas las cosas que vivimos juntas.

A Paquita a quien admiro por ser una gran amiga y compañera en todo momento espero tener siempre su amistad. A mis compañeros de Pregrado Jose Luis, Marcelo, Yomara, Alfonzo, Francisco, Maritza, Jorge y Juan Carlos que hicieron que cada día fuera placentero.

A mis mejores y encarecidas amigas Hortensia, Yenny y Mercedes que a pesar de estar distantes siempre estuvieron y las tendré en mi corazón. Nunca me olvidé de ustedes, aunque todo parecía indicarlo contrario.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Gonzalo Tamayo Castañeda

Director de Unidad Académica

Blgo. Richard Duque Marín

Coordinador de Escuela

Blga. Erika Salavarría Palma

Tutor


Blga. Diana Chiliquina Burgos

Docente de Área

Ab. Pedro Reyes Láinez

Secretario General-Procurador

ÍNDICE GENERAL

	Pags.
ÍNDICE.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvi
GLOSARIO.....	xviii
ABREVIATURAS.....	xxvi
RESUMEN.....	xxix
Introducción.....	1
Justificación.....	3
Objetivo.....	5
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos.....	5
Hipótesis de trabajo.....	6
CAPÍTULO II	
1. Descripción de Técnicas en Cultivos Bacterianos.....	7
1.1 Enfermedades bacterianas en sistemas de cultivo.....	7
1.2 Técnicas de cultivo microbiológico: Método tradicional.....	11
1.2.1 Medios de cultivo sólidos.....	14
1.2.2 Medios de cultivo líquidos.....	19

1.2.3 Técnicas de aislamientos para obtener cultivos puros.....	20
1.2.4 Preservación de cultivos.....	23
1.2.5 Cuantificación de los microorganismos.	25
1.2.5.1 Conteo Directo.	25
1.2.5.2 Conteo Indirecto.	26
1.3 Estudios de poblaciones bacterianas utilizando técnicas microbiológicas tradicionales.	27
1.4. Técnicas de caracterización bacteriana.....	32
14.1. Tinción de GRAM.....	32
1.4.2 Identificación Bioquímica.....	33
1.4.3 Otros métodos de identificación.....	36

CAPÍTULO II

2. Determinación del Análisis Microbiológico y Caracterización.....	39
2.1 Área de estudio.....	39
2.2 Diseño experimental.....	39
2.3 Manejo del experimento.....	41
2.3.1 Colecta de muestra.....	41
2.4 Medios de cultivos.....	42
2.5 Técnicas de siembra.....	44
2.6 Conteo y Caracterización Morfológica de las colonias.....	45
2.7 Aislamiento y Preservación de colonias.....	45

2.8 Técnicas de Identificación Bacteriana.....	47
2.8.1 Tinción de Gram.....	47
2.8.2 Método de Ryuss.....	48
2.9 Datos evaluados.....	48
2.9.1 Registro de parámetros abióticos.....	48
2.9.2 Materia orgánica del agua y del suelo.....	49
2.9.3 Sólidos suspendidos totales en agua.....	52

CAPÍTULO III

3. Análisis y Caracterización de poblaciones bacterianas en sistemas de engorde de camarón	54
3.1 Análisis microbiológico.....	54
3.1.1 Muestras de agua.....	54
3.1.2 Muestras de sedimento.....	59
3.2 Caracterización de aislados bacterianos.....	63
3.2.1 Bacterias Gram positiva (+) y bacterias Gram negativas (-) en muestras de agua.....	63
3.2.2 Bacterias Gram positiva (+) y Gram negativas (-) en muestras de sedimento	65
3.3 Parámetros Abióticos.....	66
3.3.1 Temperatura del agua.....	66
3.3.2 Salinidad.....	69

3.3.3 Potencial de hidrógeno en agua.....	72
3.3.4 Oxígeno disuelto.....	74
3.3.5 Materia orgánica en agua y sedimento.....	77
3.3.6 Sólidos suspendidos totales en agua.....	83
Conclusiones.....	86
Recomendaciones.....	88
Bibliografía.....	89
Anexos.....	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1 Método de siembra por estrías.	21
Fig.2 Método de aislamiento de colonias bacterianas: agar fundido en placas.	21
Fig. 3 Estructura de la pared bacteriana Gram positiva y Gram negativa.....	32
Fig. 4 Unidades formadoras de colonias obtenidas en AM y TCBS para muestras de agua, a)Piscina 15, b)Piscina 20, c)Invernadero G-1.	54
Fig. 5 Conteos de colonias de muestras de sedimento expresadas en UFC.g ¹ en Agar Marino y en TCBS de las piscinas a) Pis #15, b)Pis #20, c) Invernadero G1	62
Fig. 6 Valores de temperatura registradas durante el estudio. a) Pis #15 –20 b) Invernadero G1.	69
Fig. 7 Salinidad registrada en los sistemas muestreados. a) Pis #15 –20, b) Invernadero G1.	71
Fig. 8 Datos registrados de pH en los sistemas de cultivos muestreados. a) Pis #15 –20 b) Invernadero G1.	74

Fig. 9 Valores de OD registrados en los sistemas muestreados.	
a) Pis #15 –20, b) Invernadero G-1.	77
Fig. 10 Concentración de materia orgánica en muestras de agua.	
a) Pis #15 – 20 b) Invernadero G1	79
Fig.11 Valores registrados de materia orgánica en muestras de sedimento obtenidas en los sistemas de cultivos muestreados.	
a) Pis #15 b) Pis #20 c) Invernadero G1	82
Fig. 12 Niveles de Sólidos Suspendidos Totales (SST) durante los muestreos.	
a) Pis #15–20 b) Invernadero G1	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Conteos bacterianos (UFC.ml ⁻¹) máximos y mínimos en Agar Marino para muestras de agua	56
Tabla 2 Conteos bacterianos (UFC.ml ⁻¹) máximos y mínimos en Agar TCBS para muestras de agua.	56
Tabla 3 Conteos bacterianos (UFC.g ⁻¹) máximos y mínimos en AM para muestras de sedimento.	60
Tabla 4 Conteos bacterianos (UFC.g ⁻¹) máximos y mínimos en Agar TCBS para muestras de sedimento.	60
Tabla 5 Porcentajes promedio de aislados Gram positivos y Gram negativos de sistemas en muestras de agua y sedimento durante el tiempo de muestreo.	64
Tabla 6 Registros máximos y mínimos de Temperatura en los sistemas muestreados.	67

Tabla 7 Valores registrados de Salinidad máximos y mínimos en los sistemas muestreados.	70
Tabla 8 Valores máximos y mínimos de pH registrados en los sistemas muestreados	72
Tabla 9 Valores registrados máximos y mínimos de OD en los sistemas muestreados.	75
Tabla 10 Valores máximos y mínimos de MO en muestras de agua en los sistemas muestreados.	78
Tabla 11 Valores máximos y mínimos de MO en muestras de sedimento en los sistemas muestreados.	80
Tabla 12 Valores registrados máximos y mínimos de SST en los sistemas muestreados.	83

ANEXOS

Anexo 1 Conteo bacteriano en muestras de agua y sedimento (UFC.ml ⁻¹ ; UFC.g ⁻¹) reportado como bacterias totales (AM) y vibrios (TCBS) durante el transcurso del estudio	111
Anexo 2 Porcentajes de los aislados Gram negativos y Gram positivos obtenidos durante los muestreos para las piscinas PIS #15 - 20 e Invernadero G1	112
Anexo 3 Parámetros abióticos registrados en las piscinas PIS #15 - 20 e Invernadero G1 durante el estudio.	113
Anexo 4 Niveles de materia orgánica (mg.L ⁻¹) en el agua registrados en las piscinas PIS #15 - 20 e Invernadero G1 durante el estudio.	114
Anexo 5 Porcentajes de materia orgánica en sedimento registrado durante el estudio en los sistemas de cultivo	115
Anexo 6 Niveles de sólidos suspendidos totales registrados durante el estudio en los sistemas de cultivos.	115

Anexo 7 Muestras recolectadas de agua y sedimento.	116
Anexo 8 Estructura morfológica que presentan las colonias bacterianas.	116
Anexo 9 a) Aislamiento y b) Crecimiento bacteriano.	116
Anexo 10 Materiales, equipos y químicos utilizados.....	117
Anexo 11 Piscinas del sistema intensivo y semi- intensivos.....	118

GLOSARIO

Acidez: Contenido o concentración de iones de hidrógeno en una solución, que se expresa con un valor en la escala del pH. Una solución es ácida si la concentración de hidrógeno (H) es mayor que la de iones de hidróxidos (OH).

Acido desoxiribonucleico: Molécula extremadamente compleja, con un alto peso molecular que es el constituyente fundamental de los cromosomas. La molécula de ADN está formada por dos cadenas enroscadas en doble hélice, teniendo cada cadena la forma de una escalera torcida donde cada barrote está representando un nucleótido.

Aclimatación: Son ajustes fisiológicos y de comportamiento que sufren los organismos vivos para adaptarse a un suelo, agua o a un clima determinado.

Acuático (Acuícola): Nombre que reciben los animales, plantas u organismos que se desarrollan en aguas tanto dulces, estuarinas como salinas.

Agar: Agente gelificante para dar solidez a los medios de cultivo, se gelifica alrededor de los 40 ° C dependiendo del grado de pureza.

Autótrofo: Organismos que no requieren fuentes orgánicas para sintetizar y elaborar su propio alimento. Las plantas representan el caso más abundante de autótrofos, pues sólo requieren luz y algunos compuestos minerales para vivir.

Asepsia: Ausencia de microorganismos en un objeto o área, para evitar de esta forma contaminación.

Bacteria: Organismos procarióticos unicelulares, algunos transmiten enfermedades. La mayor parte son descomponedores, degradadores y obtienen los nutrientes que necesitan degradando los compuestos orgánicos complejos a compuestos inorgánicos simples.

Bacterias Aerobias: Bacterias que se desarrollan en presencia de oxígeno libre.

Bacterias Alotróficas: Son aquellas que requieren de sustancias orgánicas previamente sintetizadas para alimentarse.

Bacterias Anaerobias: Bacterias que se desarrollan en ausencia de oxígeno libre.

Bacterias Anaerobias facultativas: bacterias que se desarrollan tanto en presencia como en ausencia de oxígeno libre.

Bacteria nitrificantes: Son autótrofos que se encargan de realizar cambios importantes en los suelos al fijar en ellos el nitrógeno atmosférico.

Bacterias heterótrofas: Son aquellas que cierran el ciclo de la materia en los ecosistemas al degradar cualquier sustancia orgánica a elementos inorgánicos originales

Bacterias Microaerófilas: Bacterias que requieren de pequeñas cantidades de oxígeno libre para existir.

Bacteriostático: Fármaco o sustancia que detiene el crecimiento de las bacterias sin eliminarlas.

Cadena trófica. Cadena de seres vivos en que cada eslabón se alimenta y obtiene energía del eslabón precedente y a su vez sirve de alimento y proporciona energía al siguiente.

Cepa: Conjunto de individuos de una misma especie existente en una colonia o cultivo.

Comunidad: Conjuntos de poblaciones de todas las especies que viven e interactúan en un área dada en un tiempo en particular.

Concentración: Cantidad de una sustancia química en un volumen o peso en particular.

Contenido de oxígeno disuelto: Cantidad de oxígeno disuelto en un volumen determinado de agua a una presión y a temperaturas particulares.

Densidad: Cantidad de individuos que se encuentran en un área determinada g/Volumen.

Drenaje: Extracción del agua superficial o subterránea de una zona determinada por medios naturales o artificiales. El término drenaje suele aplicarse a la eliminación del exceso de agua con canales, desagües, zanjas, alcantarillas y otros tipos de sistemas para recoger y transportar agua.

Ecología: Estudio de interacciones de los seres vivos entre sí y con su ambiente inanimado o no vivo de materia y energía.

Ecosistema: Comunidad de diferentes especies que interactúan entre sí y con los factores físicos y químicos que conforman su entorno no vivo.

Enzima: Las enzimas son grandes proteínas que aceleran las reacciones químicas. En su estructura globular, se entrelazan y se pliegan una o más cadenas polipeptídicas, que aportan un pequeño grupo de aminoácidos para formar el sitio activo, o lugar donde se adhiere el sustrato, y en donde se realiza la reacción.

Especie: Grupo de organismos semejante en apariencia, comportamiento, procesos químicos y estructura genética.

Esterilización: Proceso que destruye todas las formas viables de cualquier tipo de vida microbiana, incluyendo destrucción de las esporas.

Eubacteria: Son la mayoría de organismos procariotas que viven en el suelo, agua y en organismos superiores.

Factor abiótico: Factor provocado por agentes climáticos, edafáticos y químicos.

Factor biótico: Factor originado por los seres vivos que afectan al ambiente.

Factor ecológico: Se refiere a factores que determinan las condiciones ecológicas en el ecosistema. Es la característica, lugar o condición del medio donde se desarrolla una comunidad que influye en la vida de uno o más organismos de la misma comunidad. Por ejemplo: zona, profundidad, iluminación y evaporación.

Factor físico: Se refiere a los parámetros que afectan al ecosistema, tales como la temperatura, iluminación y humedad.

Hábitat: Área o lugar del ambiente en donde se encuentran, habitualmente, a una determinada especie, raza o variedad de individuos.

Halófilas: Bacterias que para su crecimiento requieren altas concentraciones de sal (10 - 15%). Son aquellas bacterias aisladas del mar y en ciertos alimentos.

Luz ultravioleta: Radiación empleada para la esterilización de áreas de trabajos, este tipo de radiación posee una capacidad mutagénica y letal para las células.

Medio de cultivo: Se denomina a un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismo.

Oxidación: Se refiere a la combinación de oxígeno con otra sustancia para producir un compuesto llamado óxido. El hierro, en presencia de agua, reacciona con el oxígeno de la atmósfera formando un óxido de hierro hidratado.

pH: Índice numérico que señala la acidez o alcalinidad de una sustancia en una escala de 0 a 14, con el punto de neutralidad en 7. Las soluciones ácidas tienen pH menor de 7 y las básicas o alcalinas, pH mayor que 7.

Regeneración: Se denomina al proceso de retorno de nutrientes al agua que sigue a la degradación de los compuestos orgánicos. La regeneración es directa cuando los productos liberados al agua por el metabolismo son directamente utilizados por las plantas, tal es el caso de la mayoría de los productos de excreción de los animales marinos.

Salinidad: Expresión porcentual o peso por unidad de volumen de las sales, sólidos disueltos en el agua y en general. Es una medida de la cantidad de cloruro de sodio en el agua o en el suelo.

Sólidos disueltos totales: Concentración total de sales inorgánicas en el agua. La concentración constituye para muchos fines, una limitación importante en el uso del agua.

Sólidos totales en suspensión: Cantidades de partículas flotantes o suspendidas en la columna del agua que pueden ser separadas del líquido a través de medios físicos como la filtración.

Técnica de enriquecimiento del cultivo: Consiste en diseñar condiciones de cultivo que favorezcan específicamente al microorganismo que se quiere aislar y que se encuentra en pequeñas cantidades.

Temperatura: Propiedad de los sistemas que determina si están en equilibrio térmico

Tinción de Gram: Se denomina así por el bacteriólogo danés Cristian Gram, quién la desarrolló en 1844. Permite dividir las bacterias en dos grupos Gram positivos y Gram negativos, (se designan los dos grupos por la morfología características de sus paredes).

Topografía: Descripción de los rasgos de la superficie de cualquier área, incluyendo no sólo formas del relieve, sino también objetos y aspectos naturales como los humanos.

Vibrios: Son bacterias oportunistas que pueden causar hasta un 100 % de mortalidad en larvas y en juveniles de penaeidos, incidiendo sobre estos cuando son sometidos a condiciones de estrés.

ABREVIATURAS

AM	Agar Marino
AN	Agar Nutritivo
ANOVA	Análisis de varianza
°C	Grados Celsius
CN	Caldo Nutritivo
DAPI	4,6 Diamino -2 - Fenilindol
DNA	Acido desoxiribonucleico
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorbancia Enzima Ligado
FAME	Perfiles de ácido grasos de éster de metil
g	Gramo
G1	Invernadero G1
Ha	Hectárea
ILI	Cepa de <i>Vibrio alginolyticus</i>
KOH	Hidróxido de Potasio
L	Litro
LB	Caldo Luria Bertani
mg.L ⁻¹	miligramos / litro
ml	mililitro
Máx.	Máximo

Mín.	Mínimo
MO	Materia Orgánica
MPN	Número más probable
NaCl	Cloruro de Sodio
NC	No crecimiento
ND	No detectable
HHP	Necrosis Hepatopancreática
OD	Oxígeno Disuelto
PCA	Agar para recuento en placa
pH	Potencial de Hidrógeno
Pis	Piscina
PLFA	Análisis de fosfolípidos y ácidos grasos
®	Marca registrada
SH ₂	Gas Sulfhídrico
SPS	Agar Sulfito, Polimixina y Sulfadiacina
SST	Sólidos Suspendidos Totales
STD	Sólidos Totales Disueltos
TCBS	Agar Thiosulfato Citrato Sales Biliares
TDS	Sólidos Totales Disueltos
TSB	Caldo Trípico de Soya
TM	Toneladas métricas
UFC g ⁻¹	Unidades Formadoras de Colonias por gramo

UFC ml ⁻¹	Unidades Formadoras de Colonias por ml
μl	microlitro
UV	Ultravioleta
VVA	Agar para <i>Vibrio vulnificus</i>
VVE	Agar para la enumeración de <i>Vibrio vulnificus</i>
V/V	Volumen/Volumen
W/V	Peso/Volumen
WSSV	Síndrome del Virus de la Mancha Blanca

RESUMEN

Constantemente la industria camaronera se ha visto afectado por la presencia de algunos problemas en la producción, provocados por agentes bacterianos, como los vibrios, considerados agentes oportunistas debido al perfil patológico que provocan en los cultivos cuando están bajo la incidencia de condiciones ambientales perjudiciales. Las comunidades bacterianas no solo son vectores de enfermedades también cumplen un rol importante en los sistemas de cultivo pero se conoce muy poco respecto a la composición microbiana (niveles y especies) bajo diferentes condiciones y densidades de cultivos.

El objetivo de este trabajo fue analizar y caracterizar la microbiota bacteriana en muestras de agua y sedimento en sistemas semi-intensivos (Camaronera OPUMARSA) e intensivos (estación experimental CENAIM) durante un ciclo de cultivo en la fase de engorde del camarón *Litopenaeus vannamei*, para ello se utilizó las técnicas de la microbiología tradicional las que permitieron evaluar en cada muestreo las concentraciones de bacterias totales y vibrios.

Los resultados indicaron que las concentraciones de bacterias totales y vibrios en las muestras de agua fueron significativamente ($p < 0,05$) superiores en el sistema intensivo. En las muestras de sedimento en el sistema intensivo las concentraciones

fueron superiores a las registradas en las piscinas semi-intensivas, diferencia que no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

Para la caracterización se obtuvieron 723 aislados fueron de las muestras de agua y de sedimento, las mismas que fueron identificados mediante el método de Ryuss como Gram negativos y Gram positivos. Los aislados obtenidos en las muestra de agua en su mayoría fueron Gram negativos (-), y se registró diferencias significativas ($p > 0,05$). entre los sistemas. Los aislados Gram positivo (+) predominaron en las muestras de sedimento de los sistemas intensivos mientras que en los sistemas semi-intensivos predominaron los aislados Gram negativos (-), estadísticamente se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sistemas estudiados.

Se realizó además un registro semanal de factores abióticos como temperatura salinidad, Oxígeno disuelto y pH del agua obteniéndose valores mínimos y máximos para cada sistema, estadísticamente no se detectaron diferencias significativas para ninguno de estos parámetros entre sistemas ($p < 0,05$).

En cuanto a MO y SST en el agua las concentraciones mínimas y máximas fueron superiores en el sistema intensivo que en los sistemas semi-intensivos, esta diferencia fue significativa estadísticamente ($p < 0,05$)

En sedimento, los porcentajes mínimos y máximos de MO en el sistema intensivo fueron significativamente inferiores en relación al obtenido en las piscinas de los sistemas semi-intensivos ($p < 0.05$).

INTRODUCCIÓN

El rápido crecimiento de la industria de cultivo de camarones penaeidos en América y Asia se ha visto frenada principalmente a causa de las enfermedades (Sindermann y Lightner, 1988 *fide* San Miguel, 1996). Durante los últimos años varias enfermedades causadas por microorganismos de naturaleza viral, bacteriana, parasitaria o micótica han afectado la producción (Depto. de Comercio de los Estados Unidos, 1993 *fide* Serrano, 1996; San Miguel, 1996).

Desde que la industria camaronera se desarrolló en el país han surgido problemas asociados con varios agentes patógenos. Los virus, bacterias, hongos y protozoarios han encontrado en los cultivos un medio favorable para desarrollarse, principalmente debido al inadecuado manejo de los sistemas de producción de camarón y a la falta de estrategias de control de patógenos (Calero, 1998). Para Peeters, et. al, (1999 *fide* Balcázar, 2002) estos inconvenientes están estrechamente relacionados con las prácticas de manejo en los ciclos de producción.

Entre las enfermedades bacterianas, que han afectado el cultivo de Penaeidos en el Ecuador podemos mencionar: el Síndrome de la Gaviota, Necrosis Hepatopancreática (NHP), Micobacteriosis, el Síndrome de Bolitas y Síndrome de Zoea (Sotomayor, 2000).

En el 2004, el sector camaronero en Ecuador produjo menos del 80% de lo que producía hace 5 años, la crisis que vive la industria camaronera es un reflejo de la urgente necesidad de realizar cambios en el manejo de los sistemas de producción para evitar o controlar enfermedades (Vivanco, 2004).

El cultivo de camarón se constituyó en una de las actividades económicas de mayor crecimiento productivo durante las décadas del 70 y 80, sin embargo para la década de los 90 numerosos brotes epidémicos se registraron en el cultivo de *Penaeus vannamei*. La industria con el pasar del tiempo aprendió a sobrellevar la mayoría de estas enfermedades pero, aquellas provocadas por virus como el (WSV White Spot Virus) Virus de la Mancha Blanca han producido serios estragos hasta la actualidad.

En la acuicultura, se puede temer no solo a la aparición de cepas bacterianas patógenas, sino también a su dispersión debido a la ausencia de adecuadas medidas profilácticas y de diagnóstico (San Miguel, 1996). La mayor parte de las técnicas usadas para el diagnóstico de enfermedades en camarones penaeidos y de las investigaciones en laboratorio han sido adaptadas de la metodología tradicional usada en peces, en medicina veterinaria y en medicina general (Pico, 2004).

En 1999 se reportó oficialmente en Ecuador la presencia del Virus de la Mancha Blanca (Calderón, 1999) el mismo que se propagó hasta afectar el 100 % de las camaroneras a nivel nacional. Con el impacto del Virus de la Mancha Blanca se pudo

evidenciar el decrecimiento de la producción en el año 2000, provocando una reducción de un 65 % de la producción total (CNA, 2000).

Varios estudios proveen información de la diversidad bacteriana, abundancia de especies y variación estacional en la composición de las comunidades bacterianas. A pesar de que las técnicas moleculares evitan los errores implicados en el aislamiento de bacterias sobre medios de cultivos, pueden fallar en lo que respecta a la detección de diferencias en actividad celular. Como muchas bacterias existen en el medio ambiente en estado latente, es importante medir su actividad, de modo que las bacterias ecológicamente relevantes y no células inactivas que no contribuyen al ecosistema sean evaluadas (Ellis, 2003).

JUSTIFICACIÓN

Los microorganismos cumplen un importante rol en las piscinas de cultivo, particularmente en la productividad, nutrición de los organismos cultivados y control de enfermedades. Las bacterias han sido consideradas como un grupo simple de organismos, pero en realidad, existe una gran diversidad de especies cada una con diferentes roles e interacciones en el ecosistema tanto marino como terrestre, su importancia se debe a la función que esas tienen dentro de la cadena alimenticia y en

los ciclos de nutrientes debido a que constituyen parte integral para la producción en piscinas acuícolas.

Gran parte de las investigaciones están enfocadas al desarrollo de estrategias de manejos que permitan incrementar la producción de camarón y disminuir el impacto producido por las enfermedades de origen bacteriano sobre todo de bacterias patógenas (Gram -) a nivel de estanques, actualmente una de estas estrategias es la aplicación de poblaciones bacterianas “ probióticas ” . Antes de aplicar este tipo de bacterias se debe conocer la composición de población innata presente en los estanques, debido a que ciertas poblaciones pueden implicar o incidir negativamente causando daño a los organismos cultivados.

A pesar de que existen varios trabajos realizados sobre caracterización de la microbiota bacteriana en cultivos extensivos de penaeidos, pero poca información sobre la especie *Litopenaeus vannamei* en sistemas de engorde locales sobre todo con énfasis en análisis en muestra de agua y sedimento.

El presente estudio pretende caracterizar, las poblaciones bacterianas existentes en dos tipos de sistemas de cultivos de *Litopenaeus vannamei*: intensivos y semi-intensivos utilizando la microbiología tradicional realizando para ellos conteos de bacterias heterótrofas totales y bacterias del género *Vibrio*, aislamiento de colonias que serán identificadas como Gram positivas ó Gram negativas y a la vez se

registrarán parámetros abióticos de las piscinas muestreadas, con estos resultados se procurará dar inicio en elaborar una base en cuanto a la composición (rango y especies) normal presente en un estanque de cultivo.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la microbiota bacteriana en muestras de agua y sedimento en sistemas semi- intensivos e intensivos durante un ciclo de cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer semanalmente conteos de bacterias totales y vibrios (UFC/g, UFC/ml) para sedimento y agua de los sistemas estudiados.
- Identificar las especies bacterianas aisladas en los sistemas de cultivo seleccionados como Gram positivas ó negativas mediante el método de Ryuss y/ó Tinción de Gram.
- Determinar semanalmente niveles de sólidos suspendidos totales en agua (SST) y materia orgánica (MO) en agua y sedimento.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La aplicación de métodos microbiológicos tradicionales en la caracterización de las poblaciones bacterianas en sistemas de engorde de camarón, nos permitirá conocer la evolución de la población bacteriana cultivable a través del tiempo y estudiar las diferencias entre los dos tipos de sistemas de cultivos evaluados.

1. DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS EN CULTIVOS BACTERIANOS

1.1. ENFERMEDADES BACTERIANAS EN SISTEMAS DE CULTIVOS

La microbiota bacteriana normal desempeña un rol importante en la prevención de enfermedades, al impedir la incursión de nuevos microorganismos que ocasionalmente son patógenos (Gibson et. al, 1997). Aunque, según Lightner (1983) la mayoría de las bacterias que afectan al camarón son patógenos oportunistas que forman parte de su microbiota normal.

Según Sindermann y Lightner (1988) las enfermedades de penaeidos son causadas por una proliferación de bacterias en las piscinas debido a consecuencias del sistemas de cultivo empleado sea este intensivo, semintensivo o extensivo. Cada sistema se caracteriza por ventajas y desventajas que presentan, debido a la interacción de factores físicos, químicos y biológicos. En sistemas intensivos la alta densidad de camarones es un factor que influye en la proliferación de bacterias permitiendo esto la adaptación y selección de cepas virulentas de bacterias oportunistas asociadas al camarón. Guzmán (2004) sostiene que los sistemas de cultivos de camarón crean un ambiente artificial que incrementa no sólo la selección y adaptación sino también el crecimiento de comunidades bacterianas específicas que forman parte de la microbiota normal.

Algunas bacterias patógenas se encuentran normalmente en el medio acuático (San Miguel, 1996), como obicuas es decir formando parte del sistema de cultivo (agua y suelo) constituyendo incluso parte de la microbiota intestinal de los penaeidos (Boletín Nicovita, 1996).

Entre los géneros más frecuentes de bacterias que están implicadas como agentes causales de enfermedades en camarones penaeidos en sistemas de cultivo son los géneros *Vibrio* (Lightner and Lewis, 1975; Lightner, 1983, *fide* Parra, 2001) y *Photobacterium* spp. (Thompson, 2004; Calero, 1998).

La vibriosis es la enfermedad más común en los sistemas de cultivo, puede afectar tanto a animales cultivados o capturados en todos los estadíos de crecimiento, pero particularmente afecta a animales jóvenes, bajo ciertas condiciones de temperatura y calidad del agua. Bajos recambios de agua y poco oxígeno disuelto son otros factores que pueden ser considerados estresantes (Brock, 1990).

Diferentes especies de *Vibrios* son reportadas como patógenos oportunistas debido a que causan serios problemas en la producción de cultivo de camarón provocando hasta una mortalidad del 100 % particularmente en la población de postlarvas y juveniles (Karunasagar, Pai, Malathi, 1994; Prayitno & Latchford, 1995; Vandenberghe, Verdoncka, Lib, Xub & Swings 1998; Sudheesh & Xu 2001 *fide* Guzmán, 2004).

En estudios realizados en sistemas de cultivo de camarón *Penaeoidea* en Asia, Lavilla Pitogo (1995 *vide* Lavilla Pitogo, 1998) estudió las enfermedades bacterianas específicamente las causadas por el género *Vibrio*, reportando 11 especies de *Vibrios*, identificadas mediante aislados de las muestras investigadas.

La incidencia de *Vibrios* en los sistemas de cultivos puede ser afectada por la sobrepoblación, bajas concentraciones de oxígeno disuelto, altas temperaturas y bajos recambios de agua (Solís, 1996). Los agentes bacterianos asumen un perfil patológico bajo condiciones ambientales o fisiológicos de estrés (Gullian, 2004).

Algunas especies como *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*, han sido frecuentemente asociados a mortalidades, siendo responsables de grandes pérdidas económicas tanto en larvicultura como en engorde (Chen y Hanna, 1994; Song et. al, 1993; De la Peña et. al, 1993; Sotomayor, 2000).

El *V. harveyi* está ampliamente distribuido tanto en ambientes marinos como estuarinos, en peces y camarones aparentemente sanos y enfermos, en poblaciones silvestres y en cultivo, ha sido reportado como patógeno causante de vibriosis en ostras y camarones (*Pinctada máxima*, *Penaeus monodon* y *Penaeus japonicus*) (Pass et. al, 1987; Lavilla - Pitogo et. al, 1990).

Estudios realizados por Néder (1989) en postlarvas de camarón determinaron la presencia de bacterias de diferentes géneros tales como *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., y *Flavobacterium* spp.

A finales de la década de los años ochenta apareció en el Ecuador un brote de vibriosis masiva denominado "Síndrome de la Gaviota" el cual afectó a un gran número de piscinas de pre-engorde y engorde de *Litopenaeus vannamei*, localizadas en el Estero Salado, Río Guayas. Según Lightner, (1992) este síndrome fue causado por especies del género *Vibrio*. En muestras de hemolinfa de los camarones afectados por el "Síndrome de la Gaviota" se logró aislar especies de Vibrios como *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* (Anderson, 1998).

Vibrio penaeicida otra especie patógena identificada como causante del denominado Síndrome del 93 (Goarant et. al, 1998; Saulnier et. al, 2000) se presentó en piscinas de engorde y tanques de reproductores en Nueva Caledonia, es un tipo de vibriosis que afecta a juveniles y reproductores de *Penaeus stylirostris* (Goarant et. al, 1998).

En Taiwán según De la Peña, (1993) se observaron mortalidades por causa de *V. vulnificus* en cultivos de *Penaeus monodon* y *P. japonicus*.

Anderson et. al, (1998), logró aislar especies de vibrios como *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* en medio TCBS a partir de muestras de hemolinfa de camarones

infectados. El *V. parahaemolyticus* es frecuentemente reportado como patógeno para ciertos crustáceos marinos según Thompson (2004), mientras que el *V. alginolyticus* se encuentra también en el medio marino y según Lightner, (1998) también puede formar parte de la microbiota normal en las piscinas camaroneras.

1.2 TÉCNICAS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO: Método Tradicional

El método microbiológico clásico según Carrasco (2004) consta de las siguientes fases: (1) Dilución de la muestra, (2) Cultivo en medios de cultivos generales, los mismos que proporcionan las condiciones de crecimiento para todos los microorganismos de la muestra, (3) Cultivo en medios específicos; para la selección de grupos de organismos, (4) Conteo y (5) Identificación taxonómica mediante la evaluación de parámetros bioquímicos.

Para estudiar las bacterias es necesario que sean cultivadas en un medio ya sea líquido ó sólido. Los medios de cultivo contienen distintos nutrientes que van desde azúcares simples hasta sustancias complejas como la sangre o el extracto de caldo de carne. Para aislar o purificar una especie bacteriana a partir de una muestra formada por muchos tipos de bacterias, se siembra en un medio de cultivo sólido donde las células que se multiplican no cambian de localización; tras muchos ciclos reproductivos, cada bacteria individual genera por fisión binaria una colonia

macroscópica compuesta por millones de células similares a la original. Si esta colonia individual se siembra en un nuevo medio crecerá como cultivo puro de un solo tipo de bacteria.

Muchas especies bacterianas son parecidas morfológicamente por lo que es imposible diferenciarlas con el uso del microscopio; en este caso, para identificar cada tipo de bacteria, se estudian sus características bioquímicas sembrándolas en medios de cultivo especiales. Así, algunos medios contienen un producto que inhibe el crecimiento de la mayoría de las especies bacterianas, pero no la del tipo que deseamos averiguar si está presente.

El método tradicional es ventajoso por varias razones como ser sencillo en su manejo y uso económico lo que permite estimar la diversidad bacteriana en sistemas de cultivos mediante conteos directos o cultivo de bacterias viables en placas (Kirk, 2004).

Existen varios tipos de medios de cultivos que son utilizados según el requerimiento del microorganismo, estos medios se clasifican según:

- Estado físico en que se encuentran; medios líquidos sirven para cultivar cepas puras y medios sólidos, generalmente son utilizados para aislar bacterias y semisólido (Intriago, 1998).

- Composición; medios complejos, definidos.

- Utilización; selectivos y diferenciales.

Medios Complejos

Son utilizados cuando no se conocen los requerimientos nutricionales de alguna bacteria en particular, difícil de cultivar (Calero, 1998).

Medios Definidos

Son aquellos que requieren la adición de cantidades precisas de compuestos orgánicos o inorgánicos altamente purificados y factores de crecimientos que son requeridos por ciertas bacterias.

Medios Selectivos

Permite el desarrollo de un grupo de bacterias, inhibiendo al mismo tiempo el crecimiento de otros grupos.

Medios Diferenciales

Estos medios permiten diferenciar determinadas características metabólicas que presentan ciertos grupos bacterianos. Debido a la composición especial que presentan estos medios identifican especies bacterianas por la coloración típica que tienen al combinarse con algún producto del metabolismo bacteriano.

1.2.1 MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS

Algunas bacterias pueden crecer satisfactoriamente en cualquier medio de cultivo, otras necesitan medios especiales. Entre los requerimientos para el crecimiento microbiano tenemos requerimientos físicos como temperatura, pH, presión osmótica y requerimientos químicos del agua, fuentes de carbono, contenido de nitrógeno y oxígeno.

Otros medios de cultivo contienen determinados azúcares que sólo pueden utilizar algunas bacterias. En algunos medios se añaden indicadores de pH que cambian de color cuando uno de los nutrientes del medio es fermentado y se generan catabolitos ácidos. En otros casos si las bacterias son capaces de producir fermentación, generan gases que pueden ser apreciados cuando el cultivo se realiza en un tubo cerrado (Carvana, 1989).

Otros medios de cultivo permiten la identificación de bacterias que producen determinadas enzimas al digerir ciertos nutrientes que tiene dicho medio: algunas de ellas presentan enzimas hemolíticas capaces de romper los glóbulos rojos (Agar sangre).

Agar Thiosulfato Citrato Sales Biliares (Thiosulfate Citrate Bile Salt, TCBS)

Medio selectivo y diferencial para el desarrollo de vibrios patógenos por aislamiento, según Kobayashi et. al, (1963) este medio inhibe el crecimiento bacteriano para algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae, género *Pseudomonas* y bacterias gram positivas debido al pH 8,6 y al 0,5 % de NaCl que contiene, este medio ayuda a la identificación por medio de la diferenciación de especies que fermentan la sucrosa es empleado para aislamientos de muestras ambientales y como medio diferencial para *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, ya que estos fermentan básicamente la sacarosa.

Elliot et. al (1995) recomienda enriquecer el medio con agua de peptona alcalina de pH 8,6 con el 1 ó 2 % de NaCl. Además de recuperar vibrio con la utilización de este medio selectivo y diferencial, realizó también una comparación en cuanto a crecimiento y concentración de vibrio presentes en las placas de medio TCBS en relación a las de medio no selectivo para vibrio, confirmando la teoría que este medio es exclusivo para vibrios, utilizó este medio suplementándole el 0,5 % (w/v) de NaCl para estudiar las características morfológicas de los vibrio.

Agar Marino (Marine Agar, AM)

Medio específico para bacterias marinas donde crecen diferentes especies. Sung (2001) utilizó Agar marino 2216 (Difco®) para realizar conteos totales de bacterias heterotróficas en muestras de agua de cultivo de *Penaeus monodon*.

Agar Sulfito, Polimixina y Sulfatiacina (Agar Sulfito, Polimixina and Sulfatiacina, SPS)

Se utiliza para el crecimiento y diferenciación de *Vibrio vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, se observa una morfología de las colonias similares que en el medio TCBS (Carvana, 1989), otros autores determinaron que este medio es exclusivo para aislamiento de *V. Vulnificus* de muestras de origen ambiental.

Agar para *Vibrio vulnificus* (*Vibrio vulnificus* Agar, VV)

Este medio fue desarrollado para observar específicamente características morfológicas a demás del crecimiento y aislamiento de *Vibrio vulnificus*, es considerado como una alternativa para el medio TCBS, debido a la poca eficiencia que el TCBS tiene para recuperar *V.vulnificus* Para obtener este medio Brayton et. al, (1983) modificó la composición del agar TCBS con nutrientes, debido a que el medio TCBS tiene en su composición elementos inhibitorios como el Citrato de sodio que inhibe el crecimiento del *V.vulnificus* Harwood, (2004).

Agar Nutritivo (Nutritive Agar, AN)

Medio económico para microorganismos no muy exigentes en requerimientos nutritivos.

Agar para la enumeración de *Vibrio vulnificus* (*Vibrio vulnificus* Enumeration Agar, VVE)

En este medio las colonias de *Vibrio vulnificus* se presenta de color azul verdosa, es utilizado para realizar el test bioquímico de una muestra a analizar.

Agar para recuento en placa (Plate Count Agar, PCA)

Medio general que carece de sustancias inhibidoras e indicadores, sirve para determinar el número total de microorganismos en diferentes muestras.

Agar Cetrimide

Este medio inhibe el crecimiento de la mayoría de organismos Gram negativos, puede ser utilizado para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas*.

Agar Tripticasa de Soya (Trypticase Soy Agar, TSA)

Medio para el crecimiento de microorganismos exigentes en requerimientos nutritivos aerobios y anaerobios, es un medio que permite el crecimiento de distintas especies es recomendado para el aislamiento y purificación de bacterias antes de

realizar pruebas bioquímicas a la muestra. La aplicación del NaCl depende de la necesidad de la investigación y de los requerimientos bacterianos (Sung, 2001).

MacConkey

El agar MacConkey es un medio selectivo y diferencial para la detección de organismos coliformes y patógenos entéricos.

Este medio es ligeramente selectivo debido a la concentración de sales Biliares que presenta, ya que inhiben el crecimiento de microorganismos Gram positivos.

Agar sangre

Es un medio de uso general que permite el crecimiento tanto de microorganismos exigentes como no exigentes, incluyendo bacterias aerobias y anaerobias, aunque no es un medio de elección para anaerobios. Permite visualizar reacciones hemolíticas que producen muchas especies bacterianas.

Agar de Kligler (KIA)

Medio diferencial y complejo se utiliza por que facilita la demostración de varias características enzimáticas de ciertas bacterias, también se lo emplea para observar el comportamiento bacteriano en condiciones aerobiosis y anaerobiosis.

Determina la capacidad que tiene un organismo para atacar hidratos de carbono específicos que se encuentran en un medio de crecimiento básico con producción o no de gases y posiblemente producción de SH₂.

1.2.2 MEDIO DE CULTIVO LIQUIDOS

Caldo Trípico de soya (Tríptic Soy Broth, TSB)

Este medio permite el crecimiento de diferentes especies bacterianas que se encuentran en una muestra a analizar, por ser versátil y altamente nutritivo, es recomendado para usos generales de laboratorio.

Es utilizado para el mantenimiento de cepas bacterianas en congelación durante largos periodos (medio crioprotector) o para recuperar cepas bacterianas. Alavandi (2004), utilizó este medio para la selección de bacterias probióticas a partir de muestras de camarones juveniles de *Penaeus monodon*.

Caldo Luria Bertani (Luria Bertani Broth, LB)

Medio utilizado para aislar y preservar cepas bacterianas, se caracteriza por presentar una variedad de nutrientes, los mismos que permitirán el crecimiento y el desarrollo de diferentes microorganismos de sistemas estuarinos, dulceacuícolas y marinos.

1.2.3 TÉCNICAS DE AISLAMIENTOS PARA OBTENER CULTIVOS PUROS

Técnica de inoculación

Es una técnica usada para el aislamiento de colonias permite el recuento de bacterias viables en la muestra si se conoce exactamente el volumen de la muestra sembrada.

Si la siembra se ha realizado de forma correcta podrán diferenciarse las colonias de acuerdo a su tamaño, forma color y textura (Carvana, 1989).

Aislamiento (cultivo puro)

Existen varios métodos para el aislamiento: (1) Sembrado por estrías en medio sólido,(2) Incorporación en medio sólido fundido (vertido en placas), (3)Dilución en un medio líquido, (4)Cultivo y agitación en agar ("roll tubes"), (5)Aislamiento a partir de una sola célula.

Siembra por estría en medio sólido

Se utiliza para aislar colonias bacterianas, (Figura 1) es indispensable confirmar la pureza de los aislados, éstos deben presentar las siguientes características:

- Se desarrolla el mismo tipo de colonias en sub-cultivos sucesivos.
- Las células presentan la misma morfología (Tinción de Gram).
- Todas las bacterias presentan la misma motilidad.

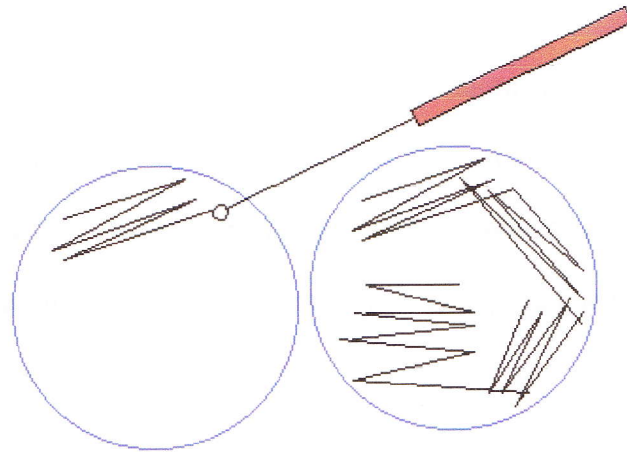


Fig. 1 Método de siembra por estrías

FUENTE: <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/practicas>.

Vertido en placas

Esta técnica es utilizada para análisis ambientales y conteos bacterianos totales esta técnica consiste en mezclar una determinada cantidad de una dilución de la muestra en el medio de agar fundido (Montealegre, 2002) Figura 2

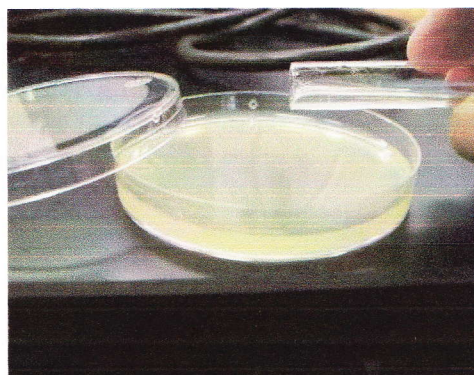


Fig. 2 Método de aislamiento de colonias bacterianas: Agar fundido en placas

FUENTE: <http://www.mycomasters.com/Esp/Vertiendo.html>.

Dilución en medio líquidos

Se utiliza para bacterias que tienen poco crecimiento en medio sólido; consiste en preparar una serie de diluciones sucesivas, la concentración bacteriana que exista se comprobará por la turbidez que se presente en los últimos tubos de las diluciones. También se utiliza para estudiar bacterias marinas especialmente las de pequeños tamaños (Atlas y Bartha, 2002).

Cultivo y Agitación en agar (roll tubes)

Este método se utiliza para reducir o inhibir el acceso de oxígeno de los microorganismos, es adecuado para anaerobios estrictos, y para ciertas bacterias reductoras de sulfato.

Aislamiento a partir de una sola célula

El método consiste en diluir una suspensión (cultivo de enriquecimiento) de tal forma que 1 gota (2mm de diámetro) logre contener una sola célula, luego se coloca gota en el porta objeto para proceder a observar con el microscopio de contraste de fase y seleccionar así la muestra.

1.2.4 PRESERVACION DE CULTIVOS

La preservación se utiliza como una herramienta para mantener los aislados bacterianos y así evitar alteraciones en número, variedad y distribución de los mismos, también es empleada para prevenir los cambios genéticos que podrían presentarse en alguna de las especies bacterianas.

Entre los principales métodos de preservación tenemos: (1) Sub-cultivo, (2) Secado, (3) Liofilización y (4) Congelación

Sub-cultivo

Consiste en resembrar el microorganismo cada cierto tiempo en un medio adecuado; generalmente se utiliza agar inclinado. Este método es válido para cortos períodos de preservación (7 - 15 días).

Secado

La deshidratación (eliminación del agua) es un método de conservación que reduce drásticamente el metabolismo de los microorganismos. Sin embargo, no todos los microorganismos sobreviven a estos métodos de secado, por lo que se hace necesario añadir agentes protectores, estos métodos son particularmente útiles para conservar microorganismos productores de esporas como hongos actinomicetos.

Liofilización

Consiste en congelar rápidamente una suspensión de microorganismos y eliminar el agua como vapor de agua directamente del hielo sin pasar por el estado intermedio líquido (sublimación). Los liófilos se conservan entre 0 y 5 °C durante muchos años.

Congelación

Consiste en eliminar la disponibilidad de agua para los microorganismos, luego las células deshidratadas son almacenadas a bajas temperaturas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ en vapor de nitrógeno, ó a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido (Pico, 2004).

Ventajas y Desventajas de la preservación

Ventajas

- 1-Mantenimiento de la viabilidad de los aislados.
- 2-Pureza

Desventajas

- 1-Cambio de la población a través de selección
- 2-Cambios genéticos
- 3-Costo de equipos

1.2.5 CUANTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Hay dos métodos principales para el recuento de microorganismos:

-La observación directa o conteo directo

2-Procedimiento indirecto o recuento de viables

1.2.5.1 CONTEO DIRECTO De Viables (Direct viability count, DVC)

Consiste en observaciones directas al microscopio (Jones y Mollison 1948; Frederick 1965; Gray et al., 1968; Harris et al 1972; Daley y Hobbie 1975; Byrd y Cowell 1992 *vide* Atlas y Bartha, 2002 . El conteo directo permite calcular el número de microorganismos en hábitat marinos, agua dulce o terrestres a pesar de las grandes diferencias en el tamaño de las poblaciones y los estados fisiológicos que se dan en estos hábitat, este método suele ser directamente proporcional a la biomasa, por lo tanto puede emplearse para calcular la biomasa microbiana (Atlas y Bartha, 2002).

Inmunofluorescencia directa

Se utiliza para la diferenciación y conteo de microorganismos de muestras ambientales (Atlas y Bartha, 2002) especialmente para bacterias no cultivables presentes en ecosistemas acuáticos.

Tinción de contraste con DAPI

Sirve para la detección y el recuento de bacterias planctónicas, se basa en detectar el DNA, pues el colorante DAPI (4,6 - Diamino - 2 - Fenilindol) se une específicamente a este (Atlas y Bartha, 2002).

1.2.5.2 CONTEOS INDIRECTOS: Técnica de conteo de viables

Se destacan dos métodos:

Técnica de conteo en placas

Es utilizado para la enumeración de microorganismos viables y favorece el crecimiento de un grupo específico de microorganismo con esta técnica se debe tener en cuenta: Composición del medio, condiciones de incubación, y período de incubación.

Técnica del número más probable (Most Probable Number MPN)

Se basa en estimar la variabilidad que presentan las bacterias normalmente distribuida en un medio, esta técnica es práctica y consiste en obtener muestras repetitivas del

mismo tamaño para luego valorarlas mediante un mismo promedio, a este promedio se lo conoce como MPN el mismo que es estandarizado a través de rangos de una tabla, si estos están dentro de los rangos preestablecidos se los consideran como tubos positivos. Se la utiliza frecuentemente para bacilos coliformes. Atlas y Bartha, (2002), Oblinger, (1995).

1.3 ESTUDIO DE POBLACIONES BACTERIANAS UTILIZANDO TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS TRADICIONALES

Los estudios realizados por Zobell (1946); Moriarty & Hayward (1982) indican que aproximadamente un 90 % de las colonias que crecen en placas de agar sembradas con agua de mar son Gram-negativas. Según estos estudios, los microorganismos Gram-positivos esporulados no abundan en la columna de agua aunque su importancia es mucho mayor en los sedimentos.

Álvarez (2000) analizó muestras de agua en piscinas de tilapia, utilizando como medio Agar Trypticosa Soya (TSA) suplementado con 1,5 % de cloruro de sodio (NaCl), obteniéndose de este análisis conteos bacterianos entre 8×10^5 y $2,8 \times 10^7$ UFC.ml⁻¹ a la vez reportó que el 95 % de los aislados bacterianos fueron bacilos Gram negativos.

Lizárraga – Partida (1986), demostró a través de un estudio en Campeche, México que los cambios climáticos son factores que condicionan el desarrollo de las bacterias tanto en el agua como en sedimento, llegándose a encontrar las más altas concentraciones de bacterias en época de lluvias para el sedimento y en época seca para el agua de un sistema lacustre.

En estudios realizados en el sedimento de piscinas de cultivo de *Penaeus monodon* analizadas en medio TCBS Lavilla - Pitogo, (1998) reportó la ausencia de vibrios en las muestras de sedimento seco; mientras niveles de $9,5 \times 10^3$ de UFC.g⁻¹ de vibrios fueron detectados en muestras de sedimento húmedo.

Vaseeharan (2003), realizó un análisis microbiológico en piscinas de cultivo de *Penaeus monodon* a partir de muestras de postlarvas y agua del tanque de cultivo, observando que las especies de *Vibrio* predominantes fueron *Vibrio harveyi* y *V. anguillarum* con una concentración de 12×10^2 CFU.ml⁻¹ y 12×10^2 CFU.g⁻¹ obtenidas mediante análisis bacteriano cuantitativo, llegándose a comprobar que dicha concentración provocó mortalidad en el cultivo de postlarvas de *Penaeus monodon*.

Ruangpan (1995), también realizó un análisis microbiológico en animales enfermos de cultivo (*P. monodon*), en donde los resultados demostraron que el 70 % de los aislados obtenidos fueron de *Vibrio harveyi*.

Álvarez (2000), en un estudio realizado a ejemplares de *Litopenaeus stylirostris* sanos y enfermos (juveniles y adultos) detectó *Vibrio harveyi* en medio TCBS, comprobando que esta especie forma parte de la flora normal de las especies analizadas, provocando epizootias en poblaciones bajo cultivo y en poblaciones silvestres sometidas a confinamiento.

Yasuda y Kitao (1980), estudiaron la población bacteriana presente en el intestino de larvas y juveniles de camarones *Penaeus japonicus*, empleando agar TCBS, logrando detectar que en todos los estadios larvarios la composición bacteriana estuvo constituida principalmente por vibrios, no solo en el intestino de los animales sino también en el agua de los tanques de cultivo.

Para cuantificar y caracterizar la flora bacteriana en piscinas de cultivo de *Penaeus monodon* Chen, (1992); Frelie et. al, (1992) utilizó un medio selectivo para Vibrios (TCBS) que le permitió valorar niveles de Vibrios luminiscentes en camarones. Ruangpan (1995) utilizó el mismo medio para aislar, bacterias de muestras de agua de mar, obteniendo un total de 180 aislados de Vibrios luminiscentes y no luminiscentes en cultivos de *P. monodon* analizados en diversas áreas de Tailandia, de los cuales el 57 % fueron obtenidos en agar TCBS suplementando con un 6 % de NaCl comprobando que esta concentración no inhibe el desarrollo de vibrios luminiscentes, ni altera la facultad de emitir luz que presentan. Debido a la capacidad de ciertos Vibrios luminiscentes y no luminiscentes de ser tolerantes a ciertas concentraciones

de salinidad estos no sólo pueden formar parte de la microbiota normal de sistemas de cultivos sino que también pueden estar presentes en sistemas estuarinos.

Oanh (1997) realizó un estudio en *Vibrio cholerae* a diferentes concentraciones de NaCl para demostrar cual es la concentración que inhibe su crecimiento utilizando para ello Agar TCBS al que le adiciono 1 % de peptona, 0,3 % caldo nutritivo y 6 % de NaCl obteniéndose con esta última concentración resultados favorables en el crecimiento, mientras que al 8 % y 10 % de NaCl no se registró crecimiento, indicando que las variaciones en concentraciones de NaCl inhibe el crecimiento de Vibrios.

En la India se realizó un estudio en el cultivo de camarón sobre la composición de la flora bacteriana analizada a través de conteos de placas totales, con la utilización de Agar TSA para muestras de agua de mar y agua de tanques de larvas, obteniéndose un rango entre 1×10^2 y 1×10^4 UFC.ml⁻¹ y 1×10^4 a 1×10^6 UFC. ml⁻¹ de bacterias respectivamente (Otta, 2001).

Rengpipat, (2003) efectuó conteos de *Bacillus* spp. (especie bacteriana utilizada como probiótico en los sistemas de cultivos), de muestras de hepatopáncreas de camarones y muestras de agua para obtener resultados que le permitieran estimar rangos de concentraciones y realizar comparaciones para conocer donde la especie bacteriana llegaba a adaptarse y colonizar mejor. Los rangos de concentraciones que se obtuvo

de las muestras en este estudio fueron de 1×10^4 a 1×10^6 UFC.g⁻¹ en hepatopáncreas y 1×10^3 a 1×10^5 UFC.ml⁻¹ en las muestra de agua.

La concentración bacteriana reportada por Barnes & Hughes, (1982) en muestras de agua de mar fue de 1×10^3 a 1×10^6 UFC.ml⁻¹, mientras que para Salmuelsson (2003 *fide* López, 2004) en sistemas acuáticos naturales, el rango reportado estuvo entre 1×10^5 y 1×10^7 UFC.ml⁻¹.

Bayot et. al, (2001) reportaron concentraciones de 1×10^4 a 1×10^6 UFC.ml⁻¹ de bacterias totales en la columna de agua en estanques de cultivo extensivos de *Litopenaeus vannamei* en Ecuador en tanto para Sung et. al, (2001, *fide* López, 2004) en piscinas de sistemas extensivo de cultivo de *Penaeus monodon* los valores reportados se ubicaron entre 8×10^4 y 3×10^6 UFC.ml⁻¹.

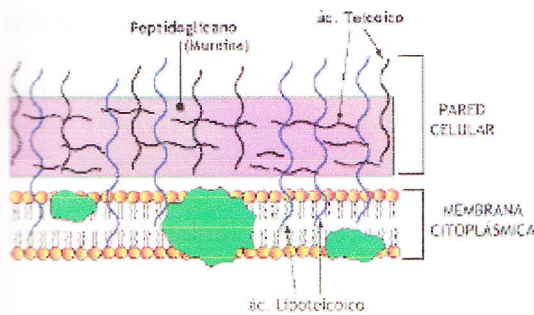
Para Carrasco (2004) los microorganismos en sedimento alcanzan densidades poblacionales muy altas con rangos entre 1×10^7 y 1×10^9 UFC.g⁻¹, mientras que en un estudio previo en CENAIM (datos no publicados) las concentraciones registradas en sedimento de piscinas camaroneras se ubicaron entre 1×10^3 y 3×10^8 UFC.g⁻¹

1.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN BACTERIANA

1.4.1 Tinción de Gram:

Es un proceso de tinción diferencial que permite detectar la estructura de la pared celular de la bacteria, las divide en dos grupos Gram negativas y Gram positivas según su estructura y la habilidad de retener el cristal violeta cuando son decoloradas por un solvente orgánico como el etanol. (Figura 3)

Bacteria Gram Positiva



Bacteria Gram Negativa

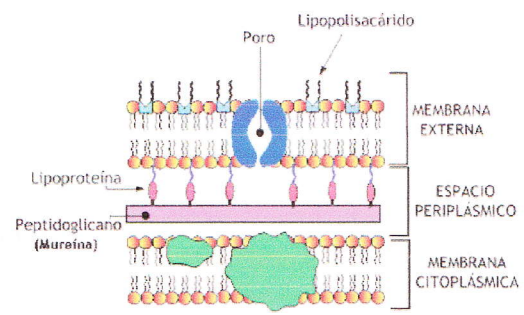


Fig. 3 Estructura de la pared bacteriana Gram positiva (+) y Gram negativa (-)

FUENTE: <http://www.conceptdraw.com/sampletour/medical/>

Se denominan bacterias Gram positivas a aquellas que retienen la tinción del cristal violeta azul y bacterias Gram negativas las que quedan rosadas con el colorante de contraste.

Existen otros tipos de tinciones, como la tinción simple que utiliza un solo colorante, por lo que todas las estructuras celulares se tiñen con la misma tonalidad (Tinta china,

Azul Metileno de Loeffler, Azul de lactofenol); Tinción diferencial en la que se utilizan varios colorantes combinados, las estructuras celulares se diferencian en función de los diferentes colorantes que se fijan de acuerdo con su propia constitución química y tinción estructural.

1.4.2 IDENTIFICACIÓN BIOQUIMICA

Consiste en utilizar medios de cultivos específicos para identificar características metabólicas (San Miguel, 1996). También se los utiliza para la caracterización y diferenciación de cepas o especies bacterianas mediante lecturas diferenciales entre aislados (Parra, 2001)

Entre los principales medios utilizados tenemos:

Métodos primarios: catalasa, oxidasa, OF (Óxido – Fermentación), crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis y motilidad.

Métodos secundarios: producción de pigmentos, producción de indol a partir de triptófano, producción de coagulasa, de fenilalanina, de aminasa, etc.

-Catalasa: Se utiliza para determinar la capacidad de producir la reacción de catálisis del peróxido de hidrógeno.

-Oxidasa: Detecta la presencia de la enzima citocromo - oxidasa que es capaz de reducir el oxígeno.

-Indol: Determina la capacidad que presenta la bacteria de desdoblar indol a partir de la molécula triptófano. También es utilizada para diferenciar en la fermentación de lactosa en cepas de *Escherichia coli*

-Voge – Proskauer: Determina la capacidad que algunos microorganismos de producir un producto final neutro acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa.

-Citrato de Simmons: Se basa en determinar si un organismo utiliza citrato como fuente de carbono para el metabolismo (Parra, 2001).

-Óxido – Fermentación: Indican el tipo de metabolismo oxidativo o fermentativo al utilizar la glucosa como sustrato.

-MR (Rojo de metilo): Mide la acidez producida por una bacteria en crecimiento en el caldo MR .

-Triple azúcar e hierro Triple Sugar Iron (TSI): Se utiliza para la identificación de bacilos entéricos Gram negativos, basándose en la producción de sulfuro de hidrógeno y fermentación de tres azúcares: dextrosa, lactosa y sucrosa.

-Pruebas de Inhibición: Consiste en utilizar ciertos compuestos que inhiben el crecimiento de ciertas bacterias. Así tenemos al específico de vibrios Agente Vibriostático (0/129) (2 – 4 diamine- 6-7 disopropyl – pteridine disk). Diferencia el género Vibrio de otros bacilos Gram negativos (San Miguel, 1996).

-Pruebas de Decarboxilasas (Lisina y Ornitina): Determina la capacidad enzimática de un organismo para decarboxilar un aminoácido para formar una amina.

-Arginina Deshidrolasa: La arginina es transformada en ornitina, amonio y dióxido de carbono.

-Nitrato: Determina la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre.

-Pruebas de Amilasa y Lipasa: Su objetivo es determinar la capacidad que tiene un organismo de producir enzimas proteolíticas (amilasa y lipasa respectivamente).

-Pruebas de Halofilia: Se lo emplea para bacterias marinas y otras no marinas que presentan tolerancia al NaCl en diversas concentraciones.

1.4.3 OTROS MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

Método de Cromatografía Gaseosa

Se utiliza para identificar productos metabólicos, en particular para la identificación de bacterias anaerobias no esporuladas como: Bacteroides, Fusobacterium, etc.

Análisis Fenotípicos

Son aquellos que se basan en aportar información fisiológica de los microorganismos mediante la expresión génica para de esta forma diferenciar cepas, a través de las propiedades bioquímicas.

Análisis Lipídicos

Son procesos que determinan la biomasa microbiana, la abundancia relativa de poblaciones microbianas específicas de un ecosistema acuáticos o terrestre, también permiten identificar a las bacterias Gram negativas específicamente la composición de la pared celular (lipopolisacáridos). Entre ellos tenemos al análisis de Perfiles de ácidos grasos de ester de metil (Fatty Acid Methyl Esters, FAME) y Análisis de fosfolípidos y ácidos grasos (Phospholipid Ester Fatty Acid, PLFA)

Métodos Inmunológicos

Consiste identificar cepas bacterianas mediante en la utilización de anticuerpos policlonales y monoclonales. Son adecuados para detectar antígenos en estudios epidemiológicos de enfermedades bacterianas (San Miguel, 1996). Entre estas técnicas tenemos el Dot blot que se la utiliza para la detección específica de bacterias aisladas de una muestra y el Colony Blot permite conocer el porcentaje de colonias bacterianas positivas en una muestra a partir de una placa de agar.

Métodos Serológicos

Ensayo de Inmunoabsorbancia de Enzima Ligada (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

Esta técnica se caracteriza por ser rápida, de gran sensibilidad y especificidad para proporcionar resultados. Utilizan anticuerpos marcados y enzimas para la identificación y cuantificación de antígenos en bacterias, virus y proteínas (Nieto, 1995). Encontramos dos variaciones del método ELISA: ELISA Competitivo y ELISA Directo.

Técnicas de Tipificación Serológica

Es la técnica más usada para la identificación y evaluación de la distribución de diferentes serotipos; esta técnica requiere la extracción del antígeno de interés a partir de colonias puras de un cultivo y mezcla con los antisueros específicos de referencia.

Permite obtener resultados rápidos para la identificación de patógenos como bacterias, parásitos y algunos virus. Este método consiste en recubrir células bacterianas con anticuerpos específicos, causando el anticuerpo presente aglutinación, esta reacción puede ser observada en pocos minutos sin requerir un equipo especializado.

2. DETERMINACIÓN DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN BACTERIANA

2.1 AREA DE ESTUDIO

El área de estudio se encuentra ubicada en la zona de Palmar (Península de Santa Elena) en donde se tomó muestras de dos tipos de cultivo: semi-intensivos (Cameronera OPUMARSA) e intensivos en la estación experimental de CENAIM.

Las muestras fueron analizadas y preservadas en el Laboratorio de Microbiología del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas "Edgar Arellano" CENAIM localizado en el kilómetro 41 vía a Manglaralto provincia del Guayas.

2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los muestreos fueron realizados por un período de cuatros meses en tres piscinas, dos de cultivo semi - intensivo de 5 Ha y 3 Ha (Tratamiento 1) con una densidad de siembra de 13 animales/m² ubicadas en la Cameronera OPUMARSA y una piscina de cultivo intensivo de 0,25 Ha con una densidad de 80 animales/m² en la estación experimental de CENAIM (Tratamiento 2).

En cada muestreo se colectaron muestras de agua y sedimento, 8 7 muestras en los sistemas semi-intensivos y 6 muestras en el sistema intensivo, se realizó una mezcla para realizar el respectivo análisis microbiológico

A partir de las muestras de agua y sedimento se determinó los niveles de bacterias heterotróficas totales y vibrios, también se caracterizaron las colonias bacterianas aisladas de las muestras como Gram positivas ó negativas.

El análisis de los datos fue realizado usando el programa estadístico Data Desk 6.1 evaluando los resultados a través de un análisis de varianza (ANOVA) para detectar las diferencias entre los niveles bacterianos obtenidos de los tratamientos (sistema intensivo con invernadero y semi- intensivos)

Se calcularon porcentajes de bacterias identificadas como Gram positivas y como Gram negativas para cada tratamiento y se determinó la existencia de diferencias significativas.

Se evaluaron los datos registrados de cada parámetros obtenidos en cada muestreos por piscinas para determinar diferencias entre tratamientos.

Cuando se encontró diferencias significativas entre tratamientos, se aplicó el test de contraste de Scheffé a un nivel de significancia $\alpha = 0,05$.

2.3. MANEJO DEL EXPERIMENTO

2.3.1 Colecta de muestra

Selección de sitios de muestreo

Se establecieron un número de puntos representativos para cada sistema muestreado, para ello, se dividió imaginariamente las piscina en secciones iguales 8 y 7 secciones para las piscinas Pis 15 y Pis 20 respectivamente y 6 secciones para el invernadero. Los muestreos se realizaron semanalmente.

Muestras de Agua

La muestra fue tomada a media columna de agua en cada punto previamente establecido de la piscina, utilizando frascos estériles de 500 ml rotulados adecuadamente.

Muestras de Sedimento

-Se utilizo un tubo de PVC (core) estéril.

-El core fue introducido a una profundidad de 5cm del sedimento de la piscina.

-Luego la muestra fue colocada en fundas plásticas previamente rotuladas.

-Después de ser recolectadas las muestras fueron transportadas en frío hasta su posterior tratamiento en el laboratorio de Microbiología.

2.4. MEDIOS DE CULTIVOS

Se utilizaron medios sólidos y líquidos:

-Agar Marino (DIFCO ®) para el crecimiento de bacterias marinas.

-Agar TCBS (DIFCO ®) para el crecimiento específico de Vibrios.

-Agar TSA (DIFCO ®) para aislamiento de colonias.

-TSB (DIFCO ®) para congelar aislado de cepas bacterianas y preservar a -80 °C.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Agar Marino

Medio específico para el desarrollo de bacterias marinas heterotróficas, permite obtener un conteo total de la flora bacteriana de la muestra. Se prepara disolviendo 55,1 gramos de agar marino en un litro de agua destilada, debido a que no es totalmente firme en estado de solidificación se le adiciona bactoagar al 0.5 %, luego se lo esteriliza por autoclave (SIBATA SCIENTIFIC TECHNOLOGY LTD., modelo DS-300) durante 15 minutos a 121 ° C y 15 libras de presión.

Agar TCBS (Agar Thiosulfato Citrato Sales Biliares)

Medio selectivo utilizado para el cultivo y aislamiento de *Vibrio*. Su selectividad esta dada por pH alto y la presencia de sales biliares. Su preparación consiste en disolver 89 gramos de medio en un litro de agua destilada, ajustando la concentración de NaCl a un 0,5 % peso/volumen (w/v), llevando a ebullición (homilla eléctrica CERAN SCHOTT) hasta su total homogenización sin presencia de grumos y esterilización.

Agar TSA (Agar Tripticasa de Soya)

Permite el crecimiento de varias especies bacterianas es recomendado para el aislamiento y purificación de colonias bacterianas previa a su identificación bioquímicas. Su preparación consiste en disolver 40 gramos de medio en un litro de agua destilada, elevando la concentración de NaCl y del agar al 2 %, por último se esteriliza por autoclave durante 15 minutos, a 121° C y 15 libras de presión.

TSB (Caldo Trípico de Soya)

Medio de cultivo que permite el crecimiento de diversas bacterias, se utiliza como medio para congelar las cepas bacterianas. Su preparación consiste en disolver 30 gramos de medio en un litro de agua destilada, con un 2 % de concentración de NaCl

y 20 % (V / V) de glicerol luego se esteriliza por autoclave durante 15 minutos, a 121 ° C y 15 libras de presión.

2.5 TÉCNICAS DE SIEMBRA:

-Las siembras se realizaron siguiendo la metodología tradicional empleando diluciones sucesivas en una relación 1:10 para las muestras de agua y sedimento.

-Cada tubo de ensayo empleado para las diluciones contiene 9 ml de solución salina al 2 % con NaCl, estéril.

-Para realizar las diluciones de la muestra de sedimento se utilizó un frasco con 90 ml de solución salina con 10 g de muestra.

-Luego se colocó 100 µl de cada dilución en su respectiva caja petri, en Agar Marino como en Agar TCBS.

-Posteriormente se realizó la siembra por el método de directo (barrido) que consiste en extender la muestra con ayuda de un asa de vidrio en forma de bastón (asa de Drygalski), previamente esterilizada al calor.

-Las placas fueron incubadas en la (INCUBADORA CONTROLLER) Model SI 450 Sibata Scientific Technology LTD, en posición invertida entre 28 - 30 °C por 24 horas para las muestras de agua, y 48 horas para las muestras de sedimento.

2.6. CONTEO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS COLONIAS

-Se realizó el conteo total de Unidades Formadoras de Colonias presentes en cada placa (UFC.ml⁻¹ ó UFC.g⁻¹) para muestra de agua y sedimento respectivamente.

-Los conteos se realizaron con la ayuda del contador de colonias (IUCHI) Digital Colony Counter DC-3.

-Luego se procedió a realizar la identificación morfológica de las colonias ver anexo 8 según el Manual de Norrell & Mesley (1997), en donde luego a cada cepa se le asignó un respectivo código, para así reportarlas por muestreos.

2.7 AISLAMIENTO Y PRESERVACIÓN DE COLONIAS:

-Una vez transcurridas las 24 horas de incubación para muestras de agua y 48 horas para las muestras de sedimento, se procedió a seleccionar las colonias que crecieron

en la placa de la dilución de mayor número de colonias, el aislamiento de cepas bacterianas se realizó en base a características morfológicas (ver 3.6) ver anexo 9.

-Las colonias seleccionadas fueron aisladas siguiendo el método de siembra por estrías.

-El aislamiento se realizó en placas de agar TSA al 0,5 % NaCl con un asa de platino previamente esterilizado.

-Luego los aislados fueron incubados entre 28 ° C y 30 ° C por 24 horas.

-Los aislados que no crecieron en el medio de cultivo TSA fueron resembrados en Agar Marino e incubados entre 28 ° C y 30 ° C por 24 horas.

-Las colonias aisladas que crecieron fueron resuspendidas en medio de congelación adecuado (TSB–Glicerol 20 %) y colocados en microtubos de 1,5 ml estériles.

-Finalmente los microtubos fueron etiquetados con sus respectivos códigos y colocados en cajas de congelación para luego ser mantenidas a -80 °C.

2.8 TECNICAS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA:

2.8.1 Tinción Gram:

Se realizo la tinción según el protocolo del manual práctico de Bacteriología Marina (Castro, 1989) brevemente:

- Realizar un frotis de la muestra sobre un portaobjeto.
- Cubrir con el colorante cristal violeta por 1 minuto enjuagar con agua y escurrir despacio.
- Adicionar la solución de Gram (yodada) por 2 a 3 minutos y enjuagar lentamente.
- Luego añadir la solución decolorante (alcohol), inclinando ligeramente la placa.
- Agregar la solución de safranina durante 30 a 60 segundos, lavar suavemente con agua y dejar secar al ambiente.
- Observar con el objetivo de inmersión (100 X), adicionando una gota de aceite de inmersión sobre la placa.

2.8.2 Método de Ryuss:

-Se realizó según el protocolo descrito en Castro (1989), con la utilización de Hidróxido de potasio (K OH 3 %)

Consiste en disolver la muestra bacteriana sobre una gota de hidróxido de potasio y con ayuda de un palillo de madera se observó la formación de un pequeño hilo característica, que permitió identificarlas como bacterias Gram negativas esto es debido a la composición de lipolisacárido que presentan las paredes bacterianas.

2.9 DATOS EVALUADOS

Se registraron parámetros abióticos como temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH, materia orgánica de agua y suelo y sólidos suspendidos en cada uno de los muestreos para todas las piscinas

2.9.1 REGISTRO DE PARÁMETROS ABIÓTICOS:

Los parámetros abióticos fueron tomados junto al muestreo, fueron registrados y reportados en sus respectivas hojas de campo.

Se tomaron y registraron los siguientes parámetros:

1.- Temperatura (°C) y Oxígeno Disuelto mg.L⁻¹

La temperatura y el oxígeno fueron tomadas con la utilización de un equipo (YSI – 85) Incorporated Yellow Springs, Ohio 45387 SN 99G1083 AU con sensor de temperatura incorporado el mismo que debe estar previamente calibrado.

2.- pH

Este parámetro fue tomado, utilizando un equipo de mano pH testr2 “double junction”.

3.- Salinidad (g.L⁻¹)

Se utilizó un refractómetro de mano marca ATAGO, Modelo 5/Mill el mismo que fue calibrado con agua destilada antes de su utilización.

2.9.2 MATERIA ORGÁNICA TOTAL (AGUA – SEDIMENTO)

MO EN AGUA

El análisis se lo realizó en el laboratorio de Análisis Ambiental Seco y Húmedo y en el Laboratorio de Análisis Ambiental Químico del CENAIM, siguiendo el protocolo estándar descrito por Boyd C., (1992) brevemente:

-Se utilizó el filtro G/C 42,5 mm diámetro (Whatman) previamente hidratado por 24 horas.

-Luego el filtro se colocó en la estufa a 103 ° C por 24 horas.

-Posteriormente se dejó enfriar el filtro por 20 minutos para después proceder a pesarlo (Mettler AE 240).

-Se filtró 100 ml de la muestra utilizando del equipo de filtración.

-Luego se llevó el filtro a la estufa por 24 horas a 103 °C.

-Se dejó enfriar el filtro por un lapso de 20 minutos y se pesó (Mettler AE 240).

-Luego los filtros fueron colocados en crisoles y llevados a la mufla a 550 °C por 30 minutos.

-Después se dejó enfriar el filtro para volver a pesarlo.

Para el cálculo del contenido de materia orgánica de las muestras se utilizó la siguiente fórmula:

$$MO = (B-A) 1000 \text{ ml/ L} / V$$

Donde:

MO = Materia orgánica (mg.L⁻¹)

B = Peso del filtro con la muestra antes de la mufla (mg)

A = Peso del filtro con muestra después de la mufla (mg)

V= Volumen de la muestra en (ml)

MO EN SEDIMENTO

El análisis en sedimento se lo realizó siguiendo el protocolo estándar descrito por Boyd C., (1995).

-La muestra de sedimento de cada muestreo fue homogenizada, y posteriormente colocadas en cajas petri para ser secadas en la estufa por 48 horas a 60 °C.

- Las muestras fueron trituradas mecánicamente y luego fueron colocadas en un mortero para obtener muestras de textura más fina.

-Se emplearon crisoles previamente lavados con ácido y secados en la estufa a 60 ° C por 2 horas.

-Posteriormente los crisoles se dejaron enfriar por 10 minutos, y se pesaron (AND Electronic Balance FY 300), para después colocar en cada crisol 2 gramos de sedimento.

-Finalmente se colocaron los crisoles en la mufla por un lapso de 8 horas a 350 °C, luego se dejaron enfriar por 15 minutos, y se pesó.

Con los datos obtenidos se procedió a utilizar la siguiente fórmula:

$$100 - [(wf - wt / wts - wt) * 100] = \%MO$$

Donde:

% OM =Concentración de materia orgánica (%)

WT = Peso tarado del crisol (g)

WF = Peso final de la muestra (g)

WTS =Peso tarado del crisol + (2 g.) de la muestra

2.9.3 SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES EN AGUA:

Se lo realizo según la metodología ya establecida en Standard Methods (1995).

-El filtro utilizado G/C 42,5mm diámetro (Whatman) fue hidratado por 24 horas.

-Luego el filtro se colocó en papel aluminio previamente rotulado y se llevó a la estufa por 24 horas a 103 ° C

-Posteriormente el filtro se dejó enfriar por 20 minutos, y se pesó (Mettler AE 240).

-Enseguida se filtró 100 ml de la muestra utilizando del equipo de filtración.

- Luego se levó el filtro a la estufa a 103 °C por 24 horas.

-Se dejó enfriar por 20 minutos para luego ser pesado (Mettler AE 240).

Con los resultados obtenidos se aplicó la siguiente fórmula para el cálculo de SST:

$$\text{SST} = \text{Pf} - \text{Pm1} * 10000 \text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$$

Donde:

SST = Sólidos Suspendidos Totales (mg.L⁻¹)

Pf = Peso del filtro (mg.L⁻¹)

Pm1 = Peso del filtro con la muestra (mg.L⁻¹)

3. ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS EN SISTEMA DE ENGORDE DE CAMARÓN

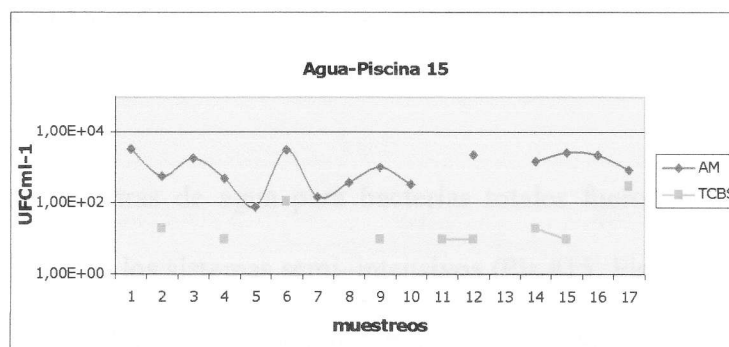
3.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO:

Para el análisis microbiológico se realizaron 17 muestreos (periodicidad semanal) entre los meses de Agosto del 2004 y Enero del 2005.

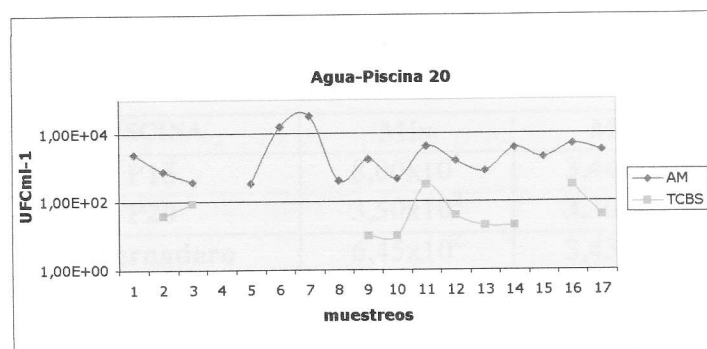
3.1.1 Muestras de agua:

Los conteos bacterianos son expresados en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para cada muestra, los resultados son presentados en la Figura 4 y Anexo 1.

a)



b)



c)

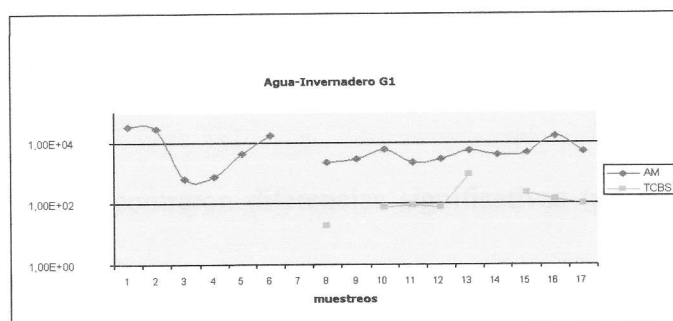


Fig. #4 Unidades formadoras de colonias obtenidas en AM y TCBS para muestras de agua, a)Piscina 15, b)Piscina 20, c)Invernadero G-1.

Los análisis de muestras de agua para bacterias totales fueron realizados en agar marino (AM) tanto en los sistemas semi-intensivos (Pis #15, Pis #20) como intensivo (Invernadero G-1). Las concentraciones mínimas y máximas de bacterias totales fueron diferentes para cada sistema de cultivo durante el transcurso de los muestreos (Tabla 1), estadísticamente se detectó diferencias significativas entre los dos tipos de sistemas de cultivo ($p < 0,05$).

Tabla 1 Conteos bacterianos (UFCml⁻¹) máximos y mínimos en Agar Marino para muestras de agua.

AM (UFCml ⁻¹)		
PISCINA	Mín	Máx
P15	8,00x10 ¹	3,44x10 ³
P20	3,50x10 ²	3,30x10 ⁴
Invernadero	6,45x10 ²	3,43x10 ⁴

Los conteos de vibrios fueron realizados en agar TCBS reportándose que las concentraciones máximas entre las piscinas del sistema semi - intensivo fueron iguales, pero se mostraron diferentes en relación al sistema intensivo (Tabla 2).

Estadísticamente se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos tipos de sistemas de cultivo.

Tabla 2 Conteos bacterianos (UFCml⁻¹) máximos y mínimos en Agar TCBS para muestras de agua.
ND= No detectable

TCBS (UFCml ⁻¹)		
PISCINA	Mín	Máx
P15	ND	3,15x10 ²
P20	ND	3,15x10 ²
Invernadero	ND	8,90x10 ²

Frecuentemente se han reportado relaciones entre invertebrados acuáticos y la microbiota bacteriana presente en el medio, tanto en alimento, agua como en el

sedimento y en ocasiones se ha relacionado la presencia de un elevado número de microorganismos con las mortalidades que se presentan en los sistemas de cultivo, en nuestro estudio, los rangos de concentraciones obtenidas para bacterias totales en sistemas semi-intensivos se ubicaron entre 8×10^1 y $3,44 \times 10^3$ UFC ml⁻¹ y entre $3,50 \times 10^2$ y $3,30 \times 10^4$ UFC ml⁻¹, piscinas 15 y 20 respectivamente, en tanto las concentraciones obtenidas en el sistema intensivo se ubicaron entre $6,45 \times 10^2$ y $3,43 \times 10^4$ UFC ml⁻¹.

En un estudio previo realizado por CENAIM (datos no publicados) se obtuvieron concentraciones promedios de 3×10^4 UFC ml⁻¹ para bacterias totales en un sistema de cultivo extensivo, en tanto en un sistema intensivo se registró una concentración de 2×10^4 UFC ml⁻¹ respectivamente, los que fueron inferiores a los registrados en nuestro estudio.

Normalmente la concentración bacteriana en el agua cultivo de camarón o en aguas costeras heterotróficas es comúnmente inferior a 1×10^6 UFCml⁻¹ (Maeda, 1992), estos niveles se mantienen bajos en el agua debido a que las bacterias sirven como alimento para protozoarios, proceso que generalmente permite conservar concentraciones bacterianas a niveles bajos. Samuelsson (2003 *fide* López, 2004) comparó la concentración bacteriana de sistemas extensivos de cultivo de camarón, rango entre 1×10^5 y 1×10^7 UFCml⁻¹, con ambientes naturales (1×10^6 UFCml⁻¹) observando que la concentración de bacterias en ambientes naturales es muy similar a

la que se presenta en los sistemas de cultivos extensivos. Por otro lado Sung et. al (2001 *fide* López, 2004) reportó un rango de concentración entre 8×10^4 y 3×10^6 UFCml⁻¹ en cultivo de *Penaeus monodon*, similar al reportado por Bayot et. al, (2001 *fide* López 2004) 1×10^4 a 1×10^6 UFCml⁻¹ para cultivos de *Litopenaeus vannamei*.

A pesar de que numerosos estudios citan que las concentraciones en el agua de cultivo de camarón o en aguas costeras heterotróficas se ubican en valores cercanos a 1×10^6 UFCml⁻¹, otros estudios como el realizado por Calderón (1998), en las camaroneras ubicadas en la zona del Golfo de Guayaquil mencionan el orden de magnitud de 1×10^7 UFCml⁻¹ como la concentración más común encontrada en las piscinas analizadas. Maeda (1992), también reportó una concentración elevada cercana a $2,46 \times 10^8$ UFCml⁻¹ en sistemas de cultivo extensivos de *Penaeus vannamei*.

En lo que concierne a niveles de *Vibrio*, nuestro estudio registró valores entre cero y $3,15 \times 10^2$ UFCml⁻¹ para los sistemas semi-intensivos, concentración que fue inferior al valor máximo obtenido en el sistema intensivo $8,90 \times 10^2$ UFCml⁻¹. Sin embargo las concentraciones de vibrios en ambos sistemas fueron superiores a las obtenidas en un estudio previo de CENAIM (datos no publicados), en el que los sistemas extensivos e intensivos registraron valores de 1×10^2 UFCml⁻¹ y 2×10^1 UFCml⁻¹ respectivamente.

Algunos autores como Lavilla-Pitogo (1998), relacionan los problemas de mortalidad con la presencia de determinadas concentraciones de vibrios en los sistemas de

cultivo, así, en un estudio realizado a piscinas de cultivo extensivo de *Penaeus monodon*, Lavilla-Pitogo relaciona un rango de 1×10^2 a 1×10^4 UFCml⁻¹ con mortalidades, sin embargo, aunque las concentraciones obtenidas de vibrios en nuestro estudio estuvieron cercanas a este rango, no existió ningún problema de mortalidad en los cultivos.

Para López (2004) en cambio la reducción en la diversidad de Vibrios implica estrés ambiental y puede emplearse como un indicador frecuente de enfermedades en penaeidos.

3.1.2 Muestras de sedimento:

Las muestras de sedimento fueron analizadas semanalmente para obtener concentraciones de bacterias totales (AM) y vibrios (TCBS) en los respectivos sistemas (Figura 5 y Anexo 1), aunque las concentraciones mínimas y máximas para cada piscina mostraron rangos diferentes (Tablas 3 y 4), el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) para los conteos de bacterias totales y Vibrios entre los sistemas de cultivo semi-intensivos e intensivo.

Tabla 3 Conteos bacterianos (UFCml⁻¹) máximos y mínimos en AM para muestras de sedimento.

AM (UFCg ⁻¹)		
PISCINA	Mín	Máx
P15	1,47 x 10 ⁶	3,71 x 10 ⁷
P20	1,05 x 10 ⁶	4,00 x 10 ⁸
Invernadero	4,70 x 10 ⁵	9,52 x 10 ⁸

Tabla 4 Conteos bacterianos (UFCml⁻¹) máximos y mínimos en Agar TCBS para muestras de ND=No detectable

TCBS (UFCg ⁻¹)		
PISCINA	Mín	Máx
P15	ND	4,60 x 10 ⁴
P20	ND	8,90 x 10 ⁴
Invernadero	ND	8,00 x 10 ⁴

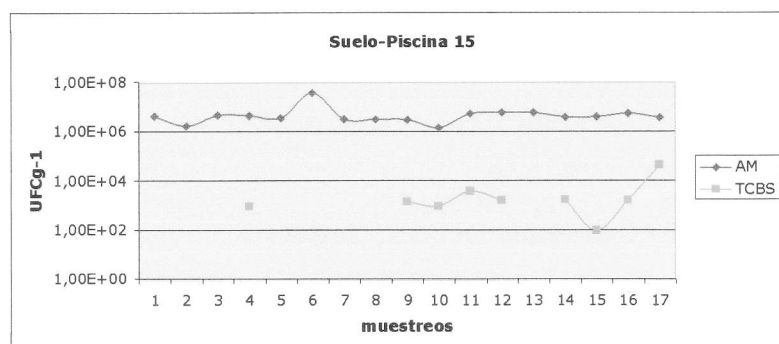
En un estudio realizado por Carrasco (2004), este manifiesta que las concentraciones de bacterias totales en sistemas extensivos de cultivo de especies marinas están entre 1×10^7 y 1×10^9 UFC.g⁻¹. Lavilla-Pitogo, (1998) en muestras de sedimento de un cultivo de *Penaeus monodon* obtuvo una concentración de bacterias totales entre $4,3 \times 10^4$ y $3,7 \times 10^5$ UFC.g⁻¹, en tanto las concentraciones bacterianas reportadas para sistemas semi-intensivos en nuestro estudio son superiores a las reportadas por Lavilla-Pitogo (1998) en cultivo de *Penaeus monodon*, pero sin embargo son menores a los reportados por Carrasco.

En lo que respecta a concentraciones de *Vibrio* nuestro estudio presentó en el sistema semi-intensivo concentraciones de $8,90 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ y $4,60 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ para las

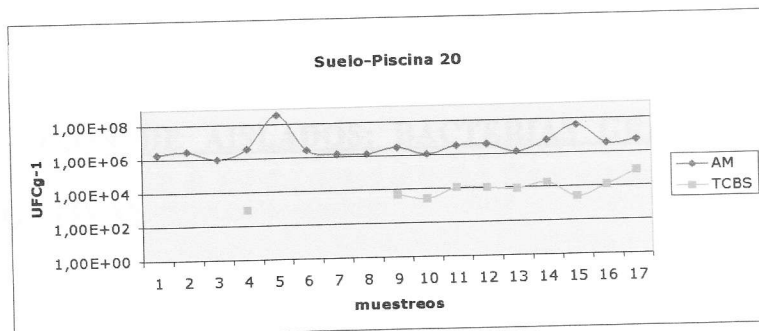
Piscina #20 y #15 respectivamente, en tanto el sistema intensivo registró valores de 8×10^4 UFC.g⁻¹, estas concentraciones son elevadas respecto a la concentración de 9×10^2 UFC.g⁻¹ obtenida en un sistema intensivo por CENAIM, (datos no publicados), y a la concentración de $9,5 \times 10^3$ UFC g⁻¹ reportada por Lavilla-Pitogo, (1998).

Calderón (1998), menciona concentraciones de Vibrios muy variables en los sistemas de cultivo de camarón, niveles de vibrio entre 1×10^5 y 1×10^7 UFC g⁻¹ son reportados para diversas piscinas ubicadas en el golfo de Guayaquil, influenciados probablemente por la gran variación de condiciones físicas y químicas del sedimento y el agua. Lizarraga- Partida (1979), sostiene que cada sistema presenta una comunidad autónoma de bacterias que se adaptan de acuerdo a las condiciones físicas, químicas, geológicas y biológicas que presenta el medio.

a)



b)



c)

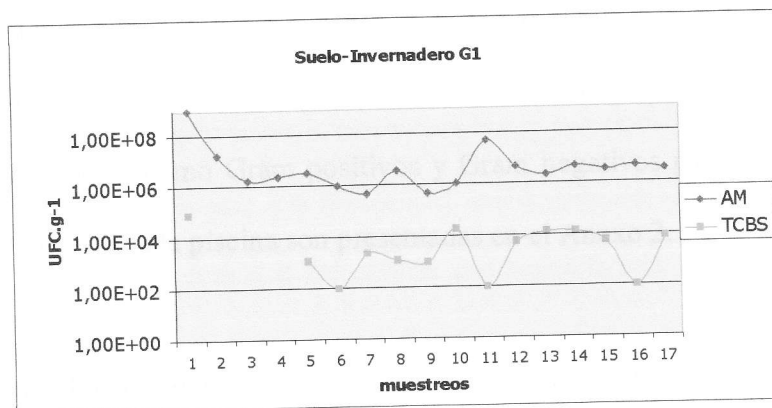


Fig.5 Conteos de colonias de muestras de sedimento expresadas en UFC.g¹ en Agar Marino y en TCBS de las piscinas a)Pis #15, b)Pis #20, c)Invernadero G1

3.2 CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS.

IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS: BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS

Se analizaron en total 723 aislados obtenidos de los sistemas de cultivos estudiados (muestra de agua-sedimento) 521 aislados en sistemas semi-intensivos (Piscinas 15 y 20) y 202 aislados en el sistema intensivo (Invernadero G-1). Los porcentajes de aislados identificados como Gram positivos y Gram negativos para las muestras de agua y sedimento de cada piscina son presentadas en el Anexo 2.

3.2.1 Bacterias Gram positivas (+) y bacterias Gram negativas (-) en muestras de agua

El porcentaje de aislados Gram negativos obtenidos de las muestras de agua en los sistemas fue de 84,6 %; 79,1 % y 78,7 % para las piscinas 15, 20 y G-1 en tanto los porcentajes promedios de aislados Gram positivos fueron de 15,4 %, 20,9 % y 21,3 % respectivamente (ver Anexo 2), a pesar de que existieron diferencias porcentuales entre los aislados bacterianos Gram positivos y Gram negativos (Tabla 5) estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de sistemas de cultivos ($p > 0,05$).

PROMEDIO	AGUA	AGUA	SEDIMENTO	SEDIMENTO
	GRAM+	GRAM -	GRAM+	GRAM -
SEMI-INTENSIVO	18,1 %	81,9 %	33 %	66,9 %
INTENSIVO	21,3 %	78,7 %	54,5 %	45,6 %

Tabla 5 Porcentajes promedio de aislados Gram positivos y Gram negativos de sistemas en muestras de agua y sedimento durante el tiempo de muestreo.

En general las bacterias Gram negativas son las que predominan en los ambientes marinos, también forman parte de la flora normal en penaeidos (Hisbi, 2000). Según Guzmán (2000), las bacterias Gram negativas presentan una interrelación negativa con larvas de camarón provocando enfermedades y por consiguiente mortalidades masivas debido al mal manejo y/o utilización inadecuada de alimentos, calidad del agua, materia orgánica y densidad del cultivo, produciendo además alteraciones en la comunidad bacteriana presente e incidiendo en el crecimiento de bacterias oportunistas en el sistema de cultivo. Los resultados obtenidos en este estudio, corroboran que los aislados obtenidos para ambos sistemas en muestras de agua en su mayoría son Gram negativos, Álvarez (2000), reportó que de los aislados obtenidos en sistemas extensivos de cultivo de *Litopenaeus vannamei* un 67 % eran Gram negativos y un 33 % Gram positivos, con estos porcentajes y los obtenidos en un estudio previo realizado por CENAIM (datos no publicados) que citan 69,6 % de aislados Gram negativos y 30,4 % de aislados positivos, se observa claramente esta dominancia de las bacterias Gram negativas en el agua de los sistemas de cultivo extensivos.

En el caso del sistema intensivo, también prevalecieron los aislados Gram negativos 78,72 % contra un 21,28 % de Gram positivos, a pesar de esto, los porcentajes obtenidos difieren de los porcentajes observados en un estudio previo de CENAIM (datos no publicados) en donde los que predominaron fueron los aislados Gram positivos con un 93.1 % frente a un 6,9 % de Gram negativos.

3.2 1 Bacterias Gram positivas (+) y bacterias Gram negativas (-) en muestras de sedimento

Los porcentajes de los aislados de las muestras de sedimento fueron en su mayoría aislados Gram negativos 67,8 % y 66 % y Gram positivos 32,2 % y 34 % para las piscinas 15 y 20 respectivamente. En el sistema intensivo, los aislados Gram positivos fueron mayoría con un 54,5 % en relación a los aislados Gram negativos con un 45,6 % (Anexo 2). Estadísticamente se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) al comparar entre sistemas dentro de los aislados Gram positivos y Gram negativos.

Las bacterias Gram negativas (característica de Vibrios) son predominantes en los ambientes marinos, según Brisou et. al (1975), constituyen la mayor parte de la flora intestinal de crustáceos y de su entorno (Siavichay, 1997, Vandenberghe et. al 1998; Conejero & Hedreyda, 2003).

Álvarez (2000), indica que las bacterias Gram negativas son las que predominan en el sedimento de los sistemas extensivos constituyendo cerca de un 80% de la población en relación a las bacterias Gram positivas, en otro estudio Moriarty & Hayward (1982), citan que las bacterias Gram positivas constituyen aproximadamente un 20% de la microbiota total presente en sedimentos.

Un porcentaje de 93.1 % de aislados Gram positivos contra 6,9 % de Gram negativos fueron observados en un estudio previo de CENAIM (datos no publicados) en sistemas intensivos, lo que corrobora los resultados obtenidos en nuestro estudio.

En contraste, los resultados de Álvarez (2003), difieren de los porcentajes reportados para sistemas semi-intensivos en nuestro estudio, pues reportó que la mayoría de los aislados fueron aislados positivos un 77 % en comparación a los aislados Gram negativos un 23 %.

3.3 PARÁMETROS ABIÓTICOS

3.3.1 Temperatura del agua

Las temperaturas máximas y mínimas registradas en los sistemas de cultivo son presentadas en la Tabla 6 para las piscinas #15, 20 y el Invernadero G-1.

Tabla 6 Registro máximos y mínimos de Temperatura en los sistemas muestreados.

TEMPERATURA (°C)		
PISCINA	Mín	Máx
P15	23	28,4
P20	23,3	27
Invernadero	30,4	34

La temperatura de la dos piscinas del sistema semi-intensivo mostró gran similitud (Figura 6 y Anexo 3) durante el tiempo de muestreo, a pesar de que la fluctuación de temperatura del agua era significativa durante el día, la temperatura registrada en el agua se mantuvo en el rango óptimo (25 °C a 30 °C) establecido por Boyd (1998), para especies de climas tropical o subtropical. Esparza (1993), en un estudio realizado en piscinas de cultivo de camarón registró una temperatura máxima y mínima de 33,6 °C y 26,0 °C para sistemas semi-intensivos y de 28,4 °C y 22,5 °C para sistemas intensivos, estos datos confirman la gran influencia de las condiciones ambientales sobre la variabilidad de este parámetro, las estaciones climáticas presentes en el año ejercen un efecto directo sobre las temperaturas registradas.

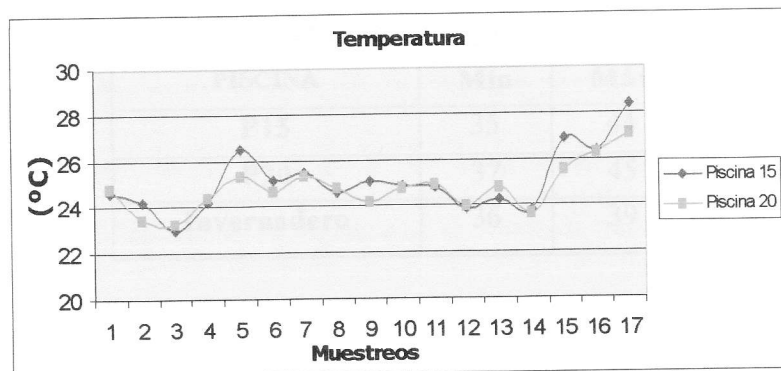
En el sistema intensivo se observó que durante los dos primeros meses de muestreos las fluctuaciones de temperatura se mantenían entre 29° C y 32 °C para luego culminar con rangos elevados de 33 °C y 34 °C, estas altas temperaturas se

explicarían por el uso del invernadero, el cual permitía que el agua retenga el calor captado durante el día.

La temperatura es una variable marcada por la estación y caracteriza en ciertos casos el mayor o menor grado de producción según la zona de cultivo. Para Modesta (1998), mantener en el agua temperaturas mayores de 28 °C acelerara el proceso de muda del camarón lo que permite tener un buen rendimiento en crecimiento, también se considera como una variable importante para determinar la calidad del agua en los sistema de cultivos, se considera un factor crítico en el control del crecimiento microbiano debido a que existen bacterias que se desarrollan satisfactoriamente a determinados rangos de temperatura, por ejemplo algunas bacterias de sedimento crecen mejor a una temperatura entre 30 °C a 35 °C según Thamdrup et al (1998).

Las concentraciones de bacterias en las muestras de sedimento se mantuvieron frecuentemente estables durante el tiempo de muestreo, probablemente se debe a que ciertas comunidades bacterianas mesófilas fueron capaces de adaptarse y crecer a ese rango de temperatura.

a)



b)

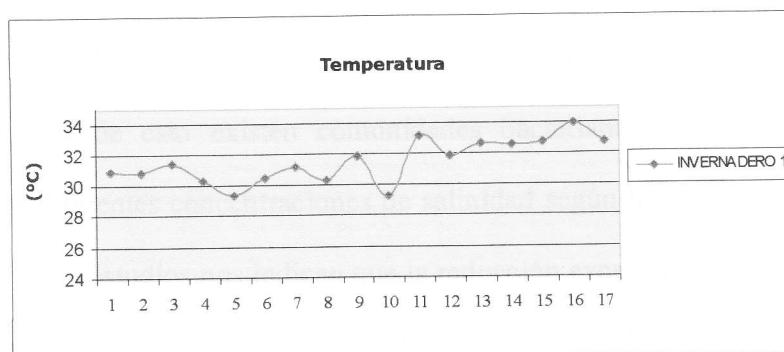


Fig.6 Valores de temperatura registradas durante el estudio a) Pis #15 – 20 b) Invernadero G1.

3.3.2 Salinidad

Los rangos mínimos y máximos de salinidad para las tres piscinas durante el transcurso del muestreo son reportados en la Tabla 7.

Tabla 7 Valores registrados de Salinidad máximos y mínimos en los sistemas muestreados.

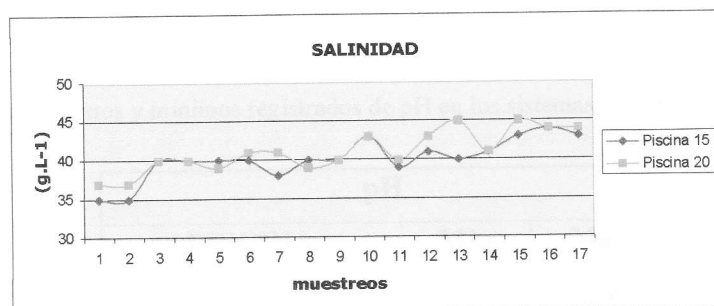
SALINIDAD (g.L⁻¹)		
PISCINA	Mín	Máx
P15	35	44
P20	37	45
Invernadero	36	39

A partir de los valores registrados de salinidad se determinó estadísticamente que no existieron diferencias significativas entre los sistemas de cultivos. Para Modesta (1998), mantener la salinidad alta ejerce un efecto bactericida sobre los sistemas de cultivo, a pesar de esto existen comunidades bacterianas que se adaptan y se desarrollan a diferentes concentraciones de salinidad según la fisiología de cada tipo de bacteria, otros estudios nos indican que la reducción excesiva de la salinidad causa fisiológicamente estrés en los crustáceos (Kautsky, 2000). Para Millan (1979), tener temperaturas bajas y una salinidad muy alta son condiciones pocos favorables para el crecimiento bacteriano en lo que concierne a bacterias patógenas.

Los datos registrados de salinidad del sistema semi-intensivo en las dos piscinas presentaron gran similitud durante el ciclo de cultivo (ver Figura 7), se observaron salinidades entre 35 g.L⁻¹ y 40 g.L⁻¹ durante los nueve primeros muestreos, además se observó que la salinidad en las piscinas muestreadas se incremento progresivamente hasta llegar a salinidades de 44 g.L⁻¹ y 45 g.L⁻¹, esto podría atribuirse a la

evaporación causada por la elevada temperatura ambiental, propio de la estación lluviosa durante la que se realizaron las mediciones. En cuanto al sistema intensivo se observó que en las primeras semanas la salinidad se encontraba cerca de 36 g.L^{-1} , luego en la semana nueve se registró un incremento cercano a 39 g.L^{-1} para posteriormente en el muestreo 11 registrar un decremento hasta cerca de 34 g.L^{-1} , para finalmente estabilizarse nuevamente cerca del valor inicial, en este sistema la salinidad puede estar influenciada primordialmente por el clima y en cierta manera por el manejo de las reposiciones o recambios de agua en la piscina. Según Álvarez (2003), rangos de salinidad entre 36 g.L^{-1} y 38 g.L^{-1} son considerados normales para el desarrollo de los camarones, en nuestro estudio se registraron valores que estuvieron dentro de este rango.

a)



b)

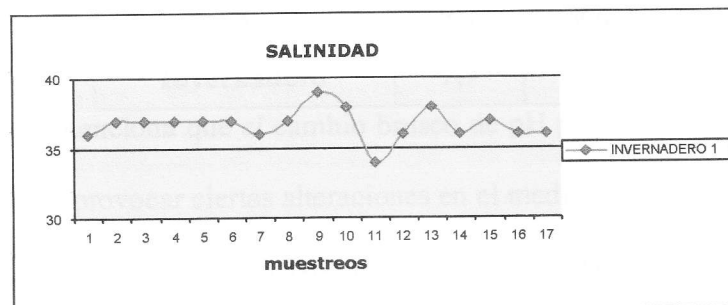


Fig.7 Salinidad registradas en los sistemas muestreados. a) Pis #15 –20, b) Invernadero G1.

3.3.3 pH

Los valores máximos y mínimos de pH registrados en las piscinas 15 y 20 e Invernadero G-1 se presentan en la Tabla 8.

Los valores máximos de pH registrados durante el transcurso de los muestreos realizados a las piscinas 15 y 20, podrían guardar cierta relación con la aplicación de un producto bioestabilizador (BIO₂H ®) empleado en la camaronera OPUMARSA, esto es evidente en el séptimo muestreo cuando se adicionó este producto a las piscinas se observa un incremento en el pH (ver Figura 8), estadísticamente los datos obtenidos de las piscinas semi-intensivas e intensiva no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Tabla 8 Valores máximos y mínimos registrados de pH en los sistemas muestreados.

pH		
PISCINA	Mín	Máx
P15	7,4	8,8
P20	7,4	8,9
Invernadero	7,7	9,2

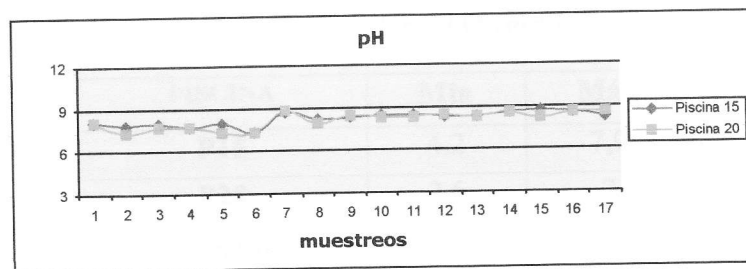
Kautsky (2000), menciona que el cambio brusco de pH provoca muertes masivas en el cultivo y puede provocar ciertas alteraciones en el medio. Los valores de pH en las piscinas del sistema semi-intensivo mantuvieron cierta semejanza durante el transcurso del muestreo (Figura8) observándose en los primeros muestreos valores de

pH entre 7 y 8, pero a partir del séptimo muestreo en adelante se mantuvieron valores de pH 8, mientras en el sistema intensivo los valores del pH se mantuvieron dentro del rango entre 7 y 8 a excepción del tercer muestreo que presentó un valor alto de 9,2, estas variaciones diurnas de pH son atribuibles a una serie de procesos biológicos que se dan en las piscinas de cultivo tales como la fotosíntesis y respiración, lo que causa por ejemplo cambios en la concentración del dióxido de carbono disuelto y por tanto afecta el pH del agua. En el sistema intensivo, el dióxido de carbono producido por las bacterias y el fitoplancton reacciona con el agua y forma ácido carbónico llegando a provocar una disminución en el pH en los sistemas.

Los valores de pH registrados en nuestro estudio son adecuados para las bacterias reductoras de materia orgánicas, pues estas son eficientes en rangos de pH entre 7 y 8. Boyd (1998), nos indica que las bacterias crecen mejor en medio neutral que en hábitat alcalinos. El pH óptimo para el crecimiento de especies acuáticas según Boyd (1990), es de 6,5 y según Tsai (1990 *vide* Boyd, 1998) de 9.

Específicamente para camarones penaeidos Boyd (1998), recomienda un rango óptimo de pH entre 5,5 y 8,5. El pH registrado en nuestro estudio en ambos sistemas de cultivos se mantuvo dentro de este rango.

a)



b)

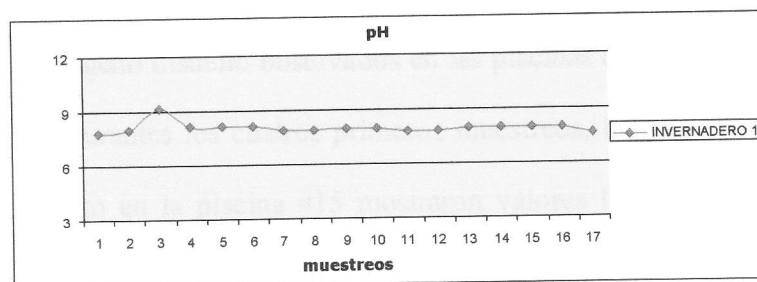


Fig.8 Datos registrados de pH en los sistemas de cultivos muestreados. a) Pis #15, 20, b) Invernadero G1

3.3.4 Oxígeno Disuelto (mg.L^{-1})

Las concentraciones de oxígeno disuelto se mantuvieron constantes durante el período de muestreo, los valores mínimos y máximos para cada sistema de cultivo son presentados en la Tabla 9. Estadísticamente estas concentraciones no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$). entre los sistemas de cultivo (semi-intensivos e intensivo).

Tabla 9 Valores máximos y mínimos registrados de OD en los sistemas muestreados.

OXIGENO DISUELTO (mg.L⁻¹)		
PISCINA	Mín	Máx
P15	4,2	7,9
P20	2,6	7
Invernadero	1,96	5,72

Los niveles de oxígeno disuelto observados en las piscinas de sistema semi-intensivo fueron similares durante los cuatros primeros muestreos, luego las concentraciones de oxígeno disuelto en la piscina #15 mostraron valores ligeramente superiores en relación a la piscina #20 hasta el último muestreo (Figura 9).

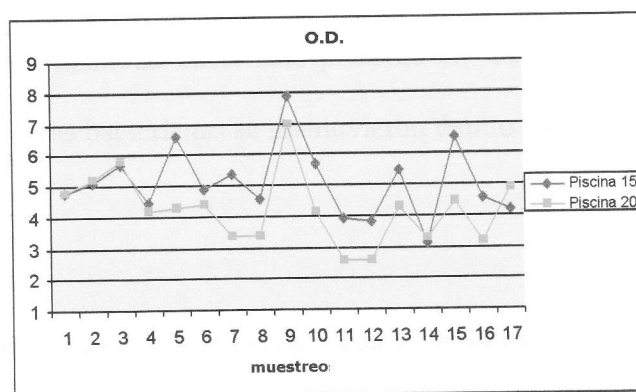
En el sistema intensivo los niveles de oxígeno disuelto fueron considerados bajos 3 y 2 mg.L⁻¹ en el tercer y noveno muestreo. Estas variaciones en el contenido de oxígeno disuelto en el agua de las piscinas se deben en parte a los procesos biológicos realizados por la presencia de población bacteriana, fitoplancton y la densidad de los animales cultivados.

El rango óptimo de contenido de oxígeno disuelto en el agua para el cultivo de camarones penaeidos se encuentra entre 4 y 5,5 mg.L⁻¹ (Boyd, 1998; Álvarez 2003), en nuestro estudio los valores registrados se mantuvieron dentro de este rango.

Kautsky (2000), indicó que los niveles bajos de oxígeno disuelto son comúnmente un problema en piscinas que tienen altas densidades de población también es un factor que incrementa la sensibilidad de los camarones *Penaeidos* a la presencia de vibriosis. En general mantener rangos bajos de oxígeno puede reducir el crecimiento y provocar deficiencias en la alimentación de los organismos cultivados. Las concentraciones de oxígeno disuelto influyen de manera directa sobre el crecimiento del camarón

(Modesta, 1998), no así sobre las comunidades bacterianas, pues, las bacterias pueden ser facultativas (crecimiento en condiciones aeróbicas y anaeróbicas). Así en las capas iniciales del sedimento del fondo de las piscinas la respiración bacteriana es aeróbica y en las capas profundas se vuelve anaeróbica (Boyd, 1995 *fide* Krebs 2003)

a)



b)

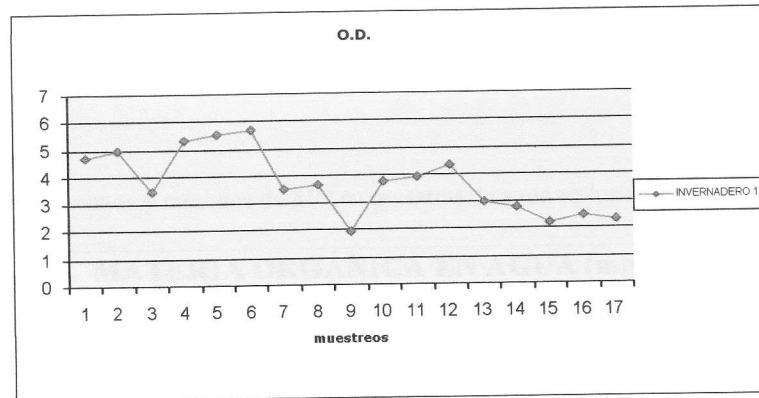


Fig. 9 Valores de OD registrados en los sistemas muestreados. a) Pis #15 -20, b) Invernadero G1.

Los parámetros abióticos en los sistemas de cultivos son factores importantes que influyen sobre el crecimiento del camarón, fluctuaciones excesivas de estos factores pueden incrementar el estrés y la susceptibilidad de los animales hacia enfermedades de etiología bacteriana, Kautsky (2000). Durante este estudio los parámetros abióticos registrados presentaron leves fluctuaciones, lo que no provocó grandes variaciones en la comunidad bacteriana presente en los cultivos, pues los niveles registrados de colonias bacterianas se mantuvieron dentro rangos observados en otros estudios.

3.3.5 MATERIA ORGANICA (M0) en Agua y Sedimento

Materia orgánica en agua

Las concentraciones máximas y mínimas de materia orgánica en el agua para la Pis #15-20 y en el invernadero G-1 durante el transcurso de los muestreos se presentan

en la Tabla 10, estadísticamente existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sistemas estudiados.

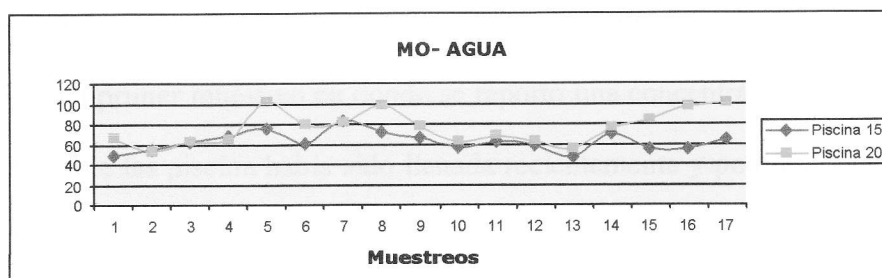
Tabla 10 Valores máximos y mínimos de MO en muestras de agua en los sistemas muestreados.

MATERIA ORGÁNICA EN AGUA (mgL^{-1})		
PISCINA	Mín	Máx
P15	47	76,7
P20	53,2	103,8
Invernadero	63,4	257,9

Las concentraciones de materia orgánica obtenidas en nuestro estudio (Figura 10, Anexo.4) son superiores a las citadas por San Millan (1979), quien indica los niveles de materia orgánica en el agua de mar se mantienen dentro de un rango que no sobrepasa los 10 mg.L^{-1} .

Las bacterias cumplen un rol importante en el reciclaje de nutrientes y sobre todo en la descomposición de materia orgánica, también se relaciona su presencia con la calidad de agua del sistema de cultivo, San Millan (1979), estima que un 40 % de esta materia orgánica es descompuesta por bacterias mientras que el resto se oxida.

a)



b)

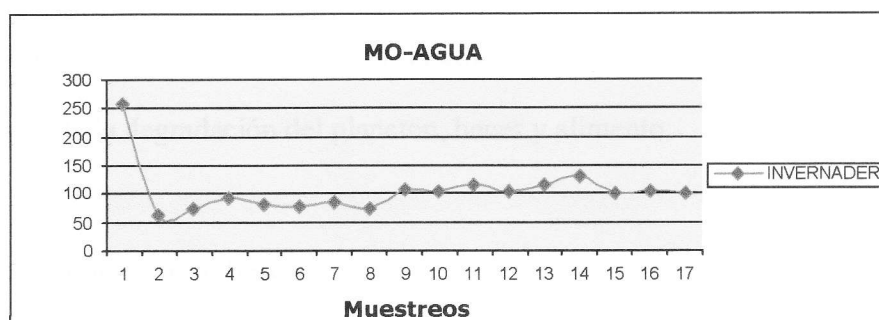


Fig. 10 Concentración de materia orgánica en muestras de agua. a) Pis #15 –20, b) Invernadero G-1

Los datos reportados de materia orgánica en el agua en la piscina #15 se mantuvieron en un rango entre 50 y 76 mg.L⁻¹ durante el tiempo del muestreo a excepción del séptimo muestreo donde se registró una concentración de 83 mg.L⁻¹ (Figura 10). En la piscina #20 durante el transcurso del muestreo no se observaron grandes variaciones a excepción del quinto y octavo muestreo en los que se registraron concentraciones de 103 mg.L⁻¹ y 98,3 mg.L⁻¹, durante los dos últimos muestreos también se registraron niveles altos de 98 mg.L⁻¹ y 101 mg.L⁻¹.

En el sistema intensivo los niveles de materia orgánica registrados durante el transcurso del muestreo se mantuvieron en un rango entre 50 mg.L⁻¹ y 150 mg.L⁻¹ a excepción del primer muestreo en donde se reportó una concentración de 250 mg.L⁻¹, atribuible a que las piscina había sido llenada recientemente y podrían contener gran cantidad de sólidos orgánicos e inorgánicos en suspensión, lo que favorecería también el crecimiento de organismos fitoplanctónicos que aportarían al contenido de Materia orgánica. Los niveles altos de materia orgánica en las piscinas se deben principalmente al aporte del plancton, la adición de nutrientes y el detritus orgánico que resulta de la degradación del plancton, heces y alimento.

Materia orgánica en sedimento

Las concentraciones de materia orgánica en sedimento mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sistemas de cultivo (Anexo .5) Las concentraciones mínimas y máximas de materia orgánica en el sedimento registrados para la Piscina #15 – 20 e Invernadero G-1 son presentadas en la Tabla .11.

Tabla 11 Valores máximos y mínimos de MO en muestras de sedimento en los sistemas muestreados.

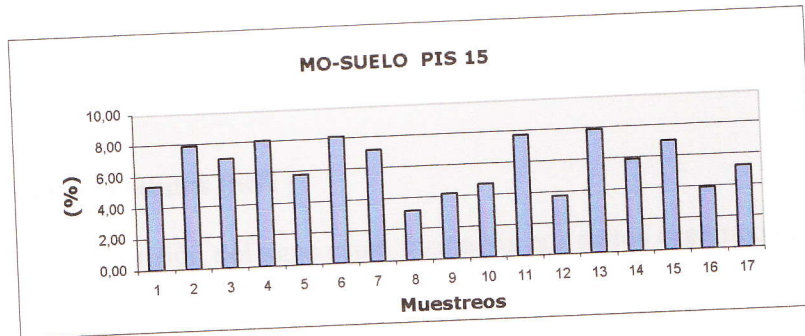
MATERIA ORGANICA EN SEDIMENTO (%)		
PISCINA	Mín	Máx
P15	3,16	8,12
P20	2,65	6,95
Invernadero	1,5	5,6

La acumulación de materia orgánica en el sedimento incrementa la demanda de oxígeno disuelto en el agua y desarrolla ciertas condiciones que favorecen a varios procesos bioquímicos realizados por las bacterias, obteniéndose de estos procesos en ocasiones compuestos tóxicos pero en cantidades mínimas como amonio, nitrito y metano, todos estos compuestos deben mantenerse en ínfimas cantidades en el medio para evitar desequilibrios.

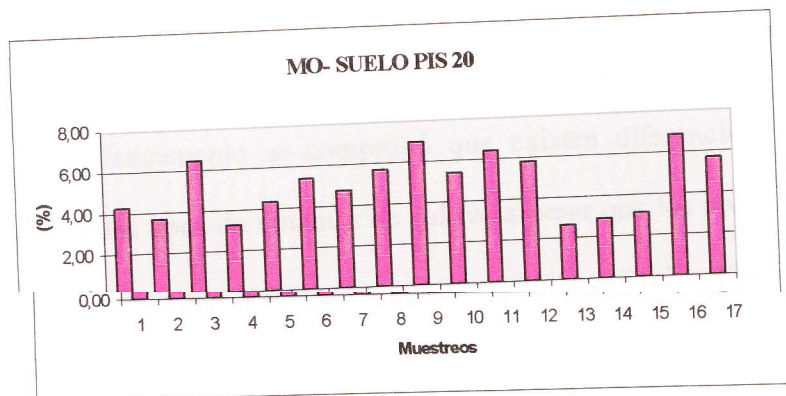
Los rangos de materia orgánica en el sedimento de los sistemas semi-intensivos durante el transcurso del muestreo fueron similares (Anexo 8). Mientras que en el sistema intensivo se reportó durante el tiempo de muestreo un rango entre 1,5 y 5,6 %.

En los sistemas extensivos de cultivo la materia orgánica puede estar afectada por la disminución de CO_2 que necesitan ciertos organismos para realizar el proceso de la fotosíntesis, la muerte del fitoplancton que se encuentra en la piscina puede pasar a formar parte del sedimento. La incidencia de altos niveles de materia orgánica en las piscinas puede beneficiar el desarrollo de bacterias patógenas en el sistema.

a)



b)



c)

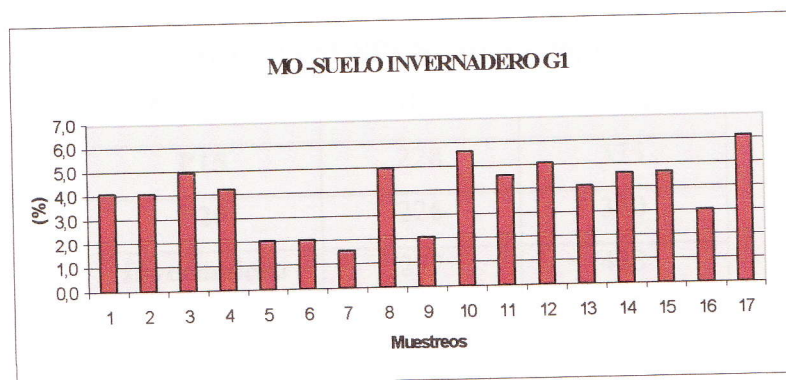


Fig. 11 Valores registrados de materia orgánica en muestras de sedimento obtenidas en los sistemas de cultivos muestreados. a) Pis#15, b) Pis#20, c) Invernadero G-1.

En las piscinas camaroneras existe una interacción entre materia orgánica y bacterias, producto de esta interacción se forma un ambiente dinámico en donde encontramos especies predominantes como *Vibrio*, *Aeromonas* y *Pseudomonas* estos géneros

bacterianos por ser oportunistas pueden producir focos de infección debido a cambios ambientales llegando así a provocar enfermedades y mortalidades López, (2004).

3.3.6 Sólidos suspendidos (SST)

Los sólidos en suspensión del agua están formados por restos orgánicos e inorgánicos que forman parte del plancton y detritus producido por el sistema.

Los niveles de SST se mantuvieron sin grandes variaciones a lo largo del muestreo (Anexo 6). Estadísticamente se comprobó que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos tipos de sistemas de cultivo a pesar que los niveles máximos y mínimos en ambos sistemas presentan rangos muy similares (Tabla 12).

Tabla 12 Valores máximos y mínimos registrados de SST en los sistemas muestreados.

SÓLIDOS SUSPENDIDOS (mgL^{-1})		
PISCINA	Mín	Máx
P15	228	375
P20	226	330
Invernadero	277	433

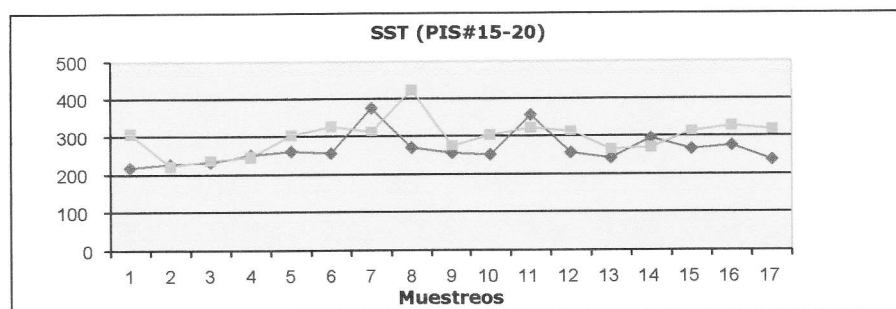
Los niveles reportados en los sistemas semi-intensivos se mantenían en un rango entre 200mg.L^{-1} y 400mg.L^{-1} , se observó también que los niveles de materia orgánica en agua mantuvieron cierta relación con los niveles obtenidos de SST, atribuible al

hecho de que los SST abarcan tanto el sólido en suspensión tanto orgánico como inorgánico.

Los rangos reportados en nuestro estudio se mantienen dentro de la concentración reportada por Boyd (1990), que indica valores entre 481 y 500mg.L⁻¹

En el sistema intensivo el rango reportado se ubicó entre 200mg.L⁻¹ y 500mg.L⁻¹ (Figura 12), rango que fue mayor al reportados por Lin, (1996 *fide* Boyd, 1998) quien cita valores normales entre 30 y 190mg. L

a)



b)

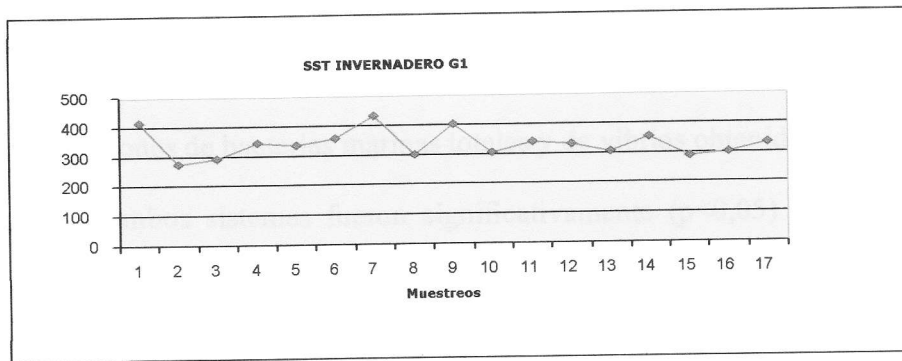


Fig. #12 Niveles de sólidos suspendidos Totales (SST) durante los muestreos. a) Pis #15-20, b) Invernadero G-1.

CONCLUSIONES

Las concentraciones de bacterias marinas totales y de vibrios obtenidas en las muestras de agua para ambos sistemas fueron significativamente ($p < 0,05$) superiores en el sistema intensivo.

Las concentraciones de bacterias marinas totales y de vibrios en las muestras de sedimento en el sistema intensivo fueron superiores a los registrados en las piscinas semi-intensivas pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

Los aislados bacterianos identificados en los sistemas intensivo y semi-intensivo en las muestras de agua fueron en su mayoría Gram negativos (-), pero no se registraron diferencias significativas entre los sistemas ($p > 0,05$).

Los aislados Gram positivos (+), fueron dominantes en las muestras de sedimento en el sistema intensivo, mientras que en el sedimento de los sistemas semi-intensivos los aislados que predominaron fueron los Gram negativos (-), estadísticamente se encontraron diferencias significativas entre los sistemas estudiados ($p < 0,05$).

Las concentraciones mínimas y máximas de MO y SST en el agua fueron mayores en el sistema intensivo que en el sistema semi-intensivos y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

El porcentaje de MO en sedimento en el sistema intensivo fue significativamente diferente al que se registró en los sistemas semi-intensivos ($p < 0.05$).

La utilización del método de Ryuss para la identificación de aislados bacterianos como Gram positivos (+) ó Gram negativos (-), demostró ser una herramienta muy útil, rápida y sencilla de aplicar.

Los parámetros abióticos, oxígeno disuelto y pH del agua no presentaron diferencias significativas entre sistemas ($p < 0.05$).

RECOMENDACIONES

Complementar con criterios y métodos bioquímicos la caracterización de los aislados bacterianos para determinar las especies bacterianas presentes.

Incrementar la frecuencia de medición de los parámetros abióticos para poder establecer correlaciones con los niveles bacterianos observados en los diferentes sistemas a través del tiempo.

Monitorear los sistemas de cultivo durante el transcurso de las dos épocas estacionales anuales (seca y lluviosa) para estudiar el comportamiento y evolución de los diversos tipos de comunidades bacterianas en el cultivo

Realizar el Método de Ryuss para la identificación de colonias bacterianas y de esta forma observar la presencia de diferencias significativas, de carácter cualitativo.

Incorporar los análisis microbiológicos y por ende la caracterización de poblaciones bacterianas en los sistemas de producción acuícola para realizar un mejor control de parámetros en el cultivo de camarón y otras especies.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Anderson, I., Shamsudin, M., Shariff, M. y Nash, G. 1998. Bacterial Septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. *Asia Fish. Sci.* 2: 93 – 108
- 2 Alavandi, S.V., K.K.Vijaya, T.C.Santiago, M.Poornima, K.P.Jithendran, S.A.Ali, J.J.S. Rajan. 2004. Evaluation of *Pseudomonas sp.* PM11 and *Vibrio fluvialis* PM17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*. 17: 115 - 120.
- 3 Alvarez, J., R. Austin, A. Alvarez y C. Agurto. 2000. Especies de *Vibrios* y *Aeromonas* aislados del intestino de camarones marinos silvestres y cultivados en Venezuela. *Veterinaria Tropical* 1: 5-27
- 4 Alvarez, J., C. Agurto 2000. Bacterioflora Gram negativa aerobia de tilapia silvestre y cultivados en la región central de Venezuela. *Veterinaria Tropical*. 1: 209 – 228.
- 5 Alvarez, J., R. Austin, A. Alvarez, J. Agurto y L. Peroza. 2003. Detección de *Baculovirus penaei* y de casos de Vibriosis en *Litopenaeus vannamei* y *L.*

- stylirostris* en una granja de la costa occidental de Venezuela. Revista Científica. 4: 55 – 262.
- 6 Atlas, R. M., Horowitz, A., Krichevsky, M.K., BEJ, A.K. 1991. Response of microbial populations to environmental disturbance. Microb. Ecol. 22: 249 – 256.
 - 7 Atlas, M. R., R. Bartha. 2002. Evolución microbiana y biodiversidad. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Addison Wesley. Pearson Educación, S. A., Madrid. Cuarta Edición. pp.37
 - 8 Austin, B. & D.A.Austin. 1993. Bacterial fish pathogens, Diseases in farmed and wild fish, Ellis Horwood Ltd., Chichester. Edición 2.
 - 9 Balcazar, J. 2000. Evaluación de Mezcla de cepas probióticas en juveniles de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Grado. Universidad de Machala. Facultad de Ciencias de Agropecuaria Escuela de Acuicultura.
 - 10 Barnes R. & Hughes R.1982. An Introduction to Marine Ecology. Second edition de Blackwell Scientific Publications.178.

- 11 Bayot, B., R. Cedeño, I. Betancourt, F. Panchana, M. Peeters, y F. Echeverría. 2001. Monitoreo epidemiológico en tres piscinas afectadas por el WSSV. El Mundo Acuícola. 7: 46 - 50.
- 12 oletín. Nicovita Camarón del mar. 1996. Vibriosis en langostino. Vol.1: N°09. http://www.nicovita.com.pe/pdf/esp/boletines/bole_9609_02.pdf
- 13 Boyd, C. 1990. Water quality in ponds for aquaculture.138- 142.
- 14 Boyd, C.E.1992. Water Quality and pond soil analyses for Aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station Auburn University. Stoneville, Misissippi 38776 pp.148.
- 15 Boyd, C.E. 1995. Bottom Soil, Sediment and pond Aquaculture. Champan y Hall, New York, EE.UU.321
- 16 Boyd, C. E., Tucker, C. 1998. Pond Aquaculture Water Quality Management. 550 – 551.
- 17 Brayton, P. R., West, P.a., Russek, E., Colwell, R.R., 1983. New selective plating medium for isolation of *Vibrio vulnificus* biogroup I. J. Clin. Microbiol. 17: 1039 – 1044.

- 18 Brisou, J. C., C. Tysset, y Rautlin de la Roy and R. Curcier. 1965. Marine bacteria especially micrococcaceae. *J. Gen. Microbiol.* 41: 23.
- 19 Brock, J. A. & Lightner, D. V. 1990. Diseases caused by microorganisms Diseases of Crustacea. Diseases of Marine Animals. Editor: Ottokine.. Published by Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. 3: 318.
- 20 Calderón, J. 1998. Informe de la primera fase de monitoreo a camareras del Golfo de Guayaquil enfocando el posible efecto del dragado del Canal de Cuarentena sobre el cultivo de camarones. *El Mundo Acuícola*. Vol 4 N° 1: 16-19.
- 21 Calderón, J., B. Bayot, I. Betancourt, y V. Alday. 1999. Monitoreo del WSSV en el Ecuador. *El Mundo Acuícola*. 5: 11 –1 4
- 22 Calero, G. 1998. Enriquecimiento de Agar marino y TCBS con caldos de músculo y hepatopáncreas de camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de grado. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. ESPOL. Guayaquil – Ecuador.

- 23 Cámara de Productores de camarón.1993. Libro Blanco del camarón. Segunda Edición. 46 - 53.
- 24 Cámara Nacional de Acuicultura. 1999. Producción de camarón Blanco en el Ecuador. 30: 34 – 37.
- 25 Cámara Nacional de Acuicultura. 2001. El cultivo de camarones tierra adentro y el medio ambiente. 43: 22 – 26.
- 26 Carrasco, L. L. 2004. Métodos de estudio de los cambios estructurales en ecosistemas microbianos edáficos y su aplicación ambiental. Ciencia al Día Internacional. 5: 1 – 24.
- 27 Carvana, F.1989. Manual práctico de Bacteriología Marina. Laboratorio de larvas de camarón. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar ESPOL. Guayaquil, Ecuador
- 28 Castro, C. F. 1989. Manual Práctico de Bacteriología Marina, Laboratorio de larvas de camarón. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar ESPOL. Guayaquil – Ecuador.

- 29 Chen, S. N., S. L. Huang and G. H. Kou. 1992. Studies on the epizootology and pathogenicity of bacterial infections in cultured giant tiger prawn, *Penaeus monodon* in Taiwan. **In:** Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. (Editors: Fulks W. and Main K.L.). Hawaii Oceanic Institute. pp. 195-205.
- 30 Chen, H., Hanna, P. J. 1994. Immunodetection of specific *Vibrios* bacteria attaching to tissues of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 20: 159 -160
- 31 CNA.2000.Acuicultura del Ecuador. Revista de la Cámara Nacional de Acuicultura. 40 - 47.
- 32 CODEMET. 1993. Libro Blanco del camarón Ecuatoriano. Capítulo 1 Edición 2.
- 33 Conejero, M. J. U., Hedreyda, C. T., 2003. Isolation of partial toxrgene of *Vibrio harveyi* and design of toxr - targeted PCR primers for species detection. *J. Appl. Microbiol.* 95: 602 – 611.

- 34 Sean Ross, D., Mills, A. L. 1989. Bacterial community structure and function along a heavy metal gradient. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2002-2009.
- 35 De la Peña, L. D., K. T. Tamaki, T. N. Momoya M, and K. Muroga. 1993. Characteristic of causative bacterium of vibriosis in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*. 115: 1-12.
- 36 Depto. de Comercio de los Estados Unidos. 1993. Los laboratorios de larvas de camarón en el Ecuador. Guía Ecuatoriana de los laboratorios de larvas de camarón, 1: 65 – 66 Guayaquil – Ecuador.
- 37 Ellis J.R; P. Morgan. A. J. Weeighman, J.C. Fry. 2003. Cultivation Dependent and Independent Approaches for determining bacterial diversity in heavy – metal contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69: 3223 – 3230.
- 38 Elliot, E. L., Kayner, C. A., Jackson, J., Tamplin, M. L. 1995. *V. cholerae*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp. *FDA Bacteriological Analytical Manual Association of Official Analytical Chemists*. 9:1 – 27.
- 39 Esparza, M. 1993. Evaluación cuantitativa y cualitativa del fitoplancton en dos sistemas de cultivo de camarón, sistemas semi –intensivo e intensivo, en

Sinaloa, México. Tesis para Licenciado en Biólogo Acuacultor. Universidad Autónoma de Sinaloa.

- 40 Freiler, P. F., Sis, R. F., Bell, T.A., Lewis, D.H. 1992. Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) culture in Texas. *Vet. Pathol.* 29: 269 – 277.
- 41 Garriques, D. & Arevalo, G. 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. En: Swimming through trouble water proceedings of the special. Session on shrimp. Forming. Papers presented at Aquaculture 195: 53-59.
- 42 Geiselbrecht, A. D., Herwing, R.P., Deming, J. W., Staley, J. T. 1996. Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon - degrading marine bacteria from puget sound sediments. *Appl. Environmental Microbiol.* 62: 3344- 3349.
- 43 Gibson, G., Saavedra, J., MacFarlane, S. y Macfarlane, G. 1997. Probiotics and intestinal infections. In: Probiotic (ed. R. Fuller) Chapman and Hall, London .2: 10 -31

- 44 Goarant, C., Régnier, F., Brizard, R., Marteau, A. L. 1998., Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostri* postlarvae and juvenile. *Aquaculture*. 169: 291 – 296.
- 45 Gómez, B. 2000. The use and selection probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 191: 259-270.
- 46 Gómez, G. B, L. T. Mayen, A. Roque, JF. Turnbull, V. Inglis, A.L. Guerra. 1998. Species of vibrios isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 163: 1 - 9.
- 47 Gullian, M., Thompson, J. Rodríguez. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 233: 1 - 14.
- 48 Guzmán, A. G; F.A. Valle. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Resent, Res. Dev. Microbiology*. 4: 333 - 348.
- 49 Guzmán, A. G; H. R. Mejía & F. Asencio. 2004. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. *Aquaculture Research*. 35: 1395 - 1404.

- 50 Hao, N.V., B. Q. Te. L .T. T. Loan, L. T. P. Yenm & L. M. Thanh. 1997. Pathogen in cultured shrimp in southern Vietnam. Diseases in Asian Aquaculture Fish Health Section, Asian Aquaculture Manila. 3: 233-239.
- 51 Hameed, A.S.Sahul.1995.Susceptibility of *Penaeus* species to a *Vibrio campbellii* - like bacterium. Journal of the world Aquaculture Societyt. 3: 310 - 315.
- 52 Harwood, V., Gandhi, P., Wright, A.. 2004. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources. a review. Journal of Microbiological Methods. 59: 301 - 316.
- 53 Hisbi, D., J. Vandenberghe, R. Robles, L. Verdonck, J. Swings and P. Sorgeloos. 2000. Characterisation of *Vibrio* and related bacteria associated with shrimp *Penaeus monodon* larvae in Indonesia. Asia Fisheries Science.13: 57 - 64.
- 54 Intriago, W. 1998. Problemas de aislamiento y caracterización de bacterias asociadas al Síndrome de Zoea II y demostración experimental de su patogenicidad. Tesis de Grado. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, ESPOL. Guayaquil – Ecuador.

- 55 Jiménez, R., Barniol, R., Machuca, M. 1996. Hepatopancreatitis necrotizante asociada a bacterias intracelulares en los cultivos de *Penaeus vannamei* en el Golfo de Guayaquil – Ecuador. *Acuicultura del Ecuador*. 15: 2-3
- 56 Karunasagar, I., Pai R., Malathi G. R. & Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon*. *Journal of Aquatic Animal Health*. 61: 27-35.
- 57 Kaustsky, N., Ronnback, P., Tendengren, M., Troell, M. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*. 191: 145-161.
- 58 Kirk, J; L.A. Beaudette, M. Hart; P. Moutoglis, J. N. Klironomos, H.Lee, J.T. Trevors. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological methods*. 58: 169 – 188
- 59 Kobayashi, T., Enomoto, S., Sakazaki, R., Kuwahara, S., 1963. A new selective isolation médium for vibrio group on a modified Nakanishishi's medium (TCBS agar medium). *Jpn. J. Bacteriol.* 18: 387 - 392.
- 60 Krebs, L. 2003. Respiración del sedimento como herramienta para evaluar calidad de fondos en Acuicultura desarrollo de un protocolo estándar para

medir dióxido de carbono. Tesis de Magíster en Ciencias. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, ESPOL. Guayaquil – Ecuador.

- 61 Lavilla - Pitogo, C. R., Baticados, C. L., Cruz – Lacierda, E. R. and De la Peña, L.D., 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*. 91: 1-13.
- 62 Lavilla - Pitogo C.; E. M. Leño; M. G. Paner. 1998. Mortalities of pond-cultured juveniles shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*. 164: 337 - 349.
- 63 Le Bitoux, J. F. 1998. Patología y terapia en las empresas de Acuicultura. *Aquane*. 2: 39 - 44.
- 64 Lighther, D. V. 1983. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: Mc. Vey, J. P., Moore, J. R. (Eds.) C.R.C. Handbook of Mariculture, Crustacean Aquaculture, Vol. 1. CRC. Press, Boca Raton, Fl. 289 – 320.
- 65 Lighther, D. V. & Lewis, D. M. 1975. A septicemic bacterial diseases syndrome of penaeid shrimp. *Mar Fish. Rev.* 37: 25 - 28.

- 66 Lightner, D.V. 1992. Shrimp Pathology: Major diseases of concern to the farming industry in the Americas. En Memoria del primer congreso Ecuatoriano de acuicultura. Guayaquil-Ecuador. 177 - 196.
- 67 Lightner, D.V. 1993. Diseases of cultured Penaeid shrimps. In: Mc Vey, J. P. (Ed.), C .R.C. Handbook of Mariculture, 2: 393 - 486.
- 68 Lightner, D.V., Reedman, R.M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture. 164: 201 - 220.
- 69 Liu, P.C., Lee K.K. & Chen S.N. 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn *Penaeus monodon*. Letters of Applied Microbiology. 22: 413-416.
- 70 Lizárraga, - Partida, M. L., 1979. These Docteur es Ciencias Naturelles. Pseudomonades du milieu marin: taxonomie polyphasique et ecologie. Universite de Provence, Frances. 117.
- 71 Lizárraga, Partida, M. L., 1986. Bacteriología de la laguna de términos Campeche México. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma México.

- 72 López, E. 2004. Relación entre el fitoplancton y el bacterioplancton bajo dos regímenes de fertilización en mesocosmos con presencia de sedimentos. Tesis de Magíster en Ciencias. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, ESPOL. Guayaquil – Ecuador.
- 73 Maeda, M., and C.Liao. 1992. Effect of Bacterial Population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture. 21: 25 - 29.
- 74 Montealegre, J. 2002. Aislamientos y cultivos puros de bacterias y hongos. Facultad Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile.
- 75 Modesta, M. 1998. Los cultivos de camarones en la Costa Caribe Colombiana. Documentos de Trabajo sobre la Economía Regional. Edición 2.
- 76 Mohny, L. L., Lightner, D. V., Bell, T. A. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond – reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacean : Decapoda) J. World Aquacult. Soc. 25: 116 - 125.

- 77 Moriarty, D.J.W., Hayward, A.C., 1982. Ultrastructure of bacteria and the proportion of Gram negative bacteria in marine sediments. *Microb. Ecologia*. 8: 1-14.
- 78 Moriarty, D. J. W. 1990. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. In: Lesel , R. *Microbiology in Poquillothems*. Elsevier. pp. 217 –2 22.
- 79 Moriarty, D.J.W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*. 151: 333 - 349.
- 80 Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in Penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*. 164: 351 - 358.
- 81 Muroga, K., Lio-Po, G., Pitogo, C. and Imada, R. 1984. *Vibrio sp* isolated from milkfish (*Chanos chanos*) with opaque eyes. *Fish. Pathol.* 19: 81 -87.
- 82 Nieto, Julia. 1995. La prueba de Elisa como técnica para el estudio de la fisiología de la reproducción en crustáceos. Tesis de Grado. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, ESPOL. Guayaquil – Ecuador.

- 83 Neder, M. 1989. Determinación de los principales tipos de bacterias que afectan al cultivo de larvas de *Penaeus vannamei*, en sus diferentes estadios larvarios. Tesis de Grado. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, ESPOL. Guayaquil – Ecuador.
- 84 Oanh, D. T., T. T. HOA., N. T. Phuong.1997. Characterization and Pathogenicity Studies on *Vibrio* Bacteria Isolated from Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) Hatcheries.
- 85 Oblinger, J. L., J. A. Koburger. 1995. Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique. J. Milk Food Technol. 38: 540 -545.
- 86 Otta, K., Karunasogar, I. 2001. Bacteriological study of shrimp, *Penaeus monodon* fabricius, hatcheries in India. J. Appl. Ichthyol. 17: 59 -63.
- 87 Otero, V., Molina, C., Cedeño, R., Sotamayor, M., Rodriguez, J. 2000. Evaluación del efecto inmuno estimulante de los β -glucanos. El mundo Acuícola. 6: 46 – 51.
- 88 Norrell, S. y K. Messley. 1997. Microbiology. Laboratory manual. Principles and applications. Prentice – Hall, A Simon and Schuster de Viacom Company. New Jersey, USA.

- 89 Parra, I. 2001. Estandarización de un método de infección artificial que permita evaluar la resistencia a enfermedades bacterianas (*Vibrio*) en postlarvas de *Penaeus vannamei*. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Carrera de Medicina Veterinaria. Bogotá, D.C.
- 90 Peeters, M., & Rodríguez, J. 1999. Problemas bacterianos en la industria camaronera ecuatoriana, prácticas de manejo y alternativas de control. Mundo Acuícola. Fundación CENAIM –ESPOL. 2-5 : 13 – 19.
- 91 Pico, C. 2004. Selección de una cepa patógena para pruebas de desafío en postlarvas de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Biólogo Marino. Universidad Católica del Ecuador Sede Regional Manabí. Campus Bahía de Caraquez.
- 92 Piña, P. 2000. Estudio comparativo de sistemas de alimentación utilizados en el engorde de *Litopenaeus vannamei*: comederos y voleo. Tesis de Grado. Universidad Técnica de Machala. Facultad de Agronomía y Acuicultura.

- 93 Pass, D. A., R. Dybdahl & M. M. Mannion. 1987. Investigations in to the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada máxima* (Jamson) in westerns Australia. *Aquaculture*. 65: 149 –169.
- 94 Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11) *Aquaculture*. 191: 271 – 288.
- 95 Rengpipat, S .2003. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Diseases of Aquatic*. 55: 169 -173.
- 96 Ruangpan, L., Taskaw, R., Yoshida, T., Kwatsu, H., Saitanu, K. 1995. Numerical taxonomy of *Vibrio spp.* Isolated from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Cultured in Thailand. *Disease in Asian. Aquaculture Fish Health Section Asian Fisheries Society* .2: 131 – 140.
- 97 San Miguel, L.1996. Caracterización de una bacteria “probiótica” en *Penaeus vannamei* y estudio in vivo de la interaction con una bacteria patógena. Tesis de Grado. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. ESPOL. Guayaquil Ecuador.

- 98 San Millan, M., Ibáñez, M. 1979. Últimos avances en el estudio de la polución del Mar I: Metales pesados, bacterias y virus. Lurralde. Instituto Geográfico Vasco San Sebastián. 2 :81 -101.
- 99 Sakata, T. 1989. Microflora of healthy animals. In: Methods for the microbiological Examination of fish and shellfish (Editors: Austin, B. y Austin D. A.) Ellis Horwood Ltd chichester, England.1: 141 – 163.
- 100 Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy P & Ansquer D. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies. A review Aquaculture.191:133-144.
- 101 Serrano, J. 1996. Optimización de un modelo experimental en larvas de camarón *Penaeus vannamei* para el control de infecciones por *Vibrio harveyi* (Cepa E22) mediante la utilización de *Vibrio alginolyticus* (cepa ILi). Tesis Acuicultor. ESPOL. Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil - Ecuador
- 102 Siavichay, K.1997. Aplicación de nuevas técnicas para el seguimiento bacteriológico en un laboratorio de larvas de camarón. Tesis de Acuicultor. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. ESPOL. Guayaquil Ecuador.

- 103 Sindermann, and Lightner, D. A. 1988. Disease diagnosis and control in North American marine Aquaculture. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. 17: 8.
- 104 Solis, A. 1996. Miniaturización y simplificación de pruebas bioquímicas de bacterias asociadas con el camarón. Tesis de Acuicultor. ESPOL. Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil – Ecuador.
- 105 Song, Y. L., Cheng W., Wang, C.H., 1993. Isolation and characterization of *Vibrio damsella* infectious for cultured shrimp in Taiwan. *J. Inverbr. Pathol.* 61: 24 -31.
- 106 Sotomayor, M. 2000. Obtención de un modelo de infección experimental en juveniles de *Penaeus vannamei*, con el *Vibrio vulnificus*. Tesis de Grado. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. ESPOL. Guayaquil - Ecuador.
- 107 Sung, H.M., Kou, G. H., Song, y. L. 1994. Vibriosis resistance induced by glucant treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) *Fish. Pathol.* 29: 11-17.

- 108 Sung, H. H.; S. F. Hsu, C. Chen, Y. Y. Ting; W. L. Chao. 2001. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of vibrios communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. *Aquaculture*. 192:101-110.
- 109 Thamdrub, B.J.W. Hansen, y B.B. Jorgensen. 1998. Temperature dependence of aerobic respiration in a costal sediment. *Microbiology Ecology*. 25: 189-200.
- 110 Thompson FL, Iida T, Swings J. 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev*. 3:403-31
- 111 Vandenberghe, J., Lib Y., Verdonka L., Lib J., Xub H.S. & Swings J. 1998. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: decapoda) larvae in *chinensis* shrimp hatcheries. *Aquaculture*. 169:121-132.
- 112 Vaseeharan, B & Ramasamy, P. 2003. Control de Pathogenic Vibrio spp. by *Bacillus subtilis* B T&3, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*. 36: 83 - 87
- 113 Vicente, J.; J. Molina. 2002. Técnico en Piscifactorías. Cultural, S. A. Edición 2: 400 - 405. Madrid - España.

- 114 Vivanco, J. 2004. Identificación de familias del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* utilizando marcadores moleculares tipo microsatélites. Tesis de Grado. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. ESPOL. Guayaquil - Ecuador.
- 115 Yasuda, K. & Kitao, T. 1980. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus*, Bate, *Acuaculture*. 19:229 – 234.
- 116 Zobell, C. E. 1946. *Marine Microbiology*. Waltham. Mass USA Proc. Soc. for Exper, Biol. and Med. pp. 240.

8. ANEXO

Anexo 1 Conteo bacteriano en muestras de agua y sedimento (UFCml⁻¹; UFC.g⁻¹) reportado como bacterias totales (AM) y vibrios (TCBS) durante el transcurso del estudio. NC= No crecimiento

PIS # 15	AGUA		SEDIMENTO	
	AM	TCBS	AM	TCBS
1	3,44E+03	0,00E+00	4,27E+06	0,00E+00
2	5,75E+02	2,00E+01	1,73E+06	0,00E+00
3	1,87E+03	0,00E+00	4,74E+06	0,00E+00
4	5,00E+02	1,00E+01	4,66E+06	1,00E+03
5	8,00E+01	0,00E+00	3,59E+06	0,00E+00
6	3,19E+03	1,20E+02	3,71E+07	0,00E+00
7	1,50E+02	0,00E+00	3,22E+06	0,00E+00
8	3,85E+02	NC	3,13E+06	NC
9	1,05E+03	1,00E+01	3,04E+06	1,50E+03
10	3,50E+02	0,00E+00	1,47E+06	1,00E+03
11	NC	1,00E+01	5,43E+06	4,00E+03
12	2,35E+03	1,00E+01	6,00E+06	1,70E+03
13	NC	0,00E+00	5,95E+06	0,00E+00
14	1,50E+03	2,00E+01	3,85E+06	1,80E+03
15	2,69E+03	1,00E+01	4,04E+06	1,00E+02
16	2,25E+03	0,00E+00	5,39E+06	1,70E+03
17	8,60E+02	3,15E+02	3,80E+06	4,60E+04
PROMEDIO	1,42E+03	3,28E+01	5,97E+06	3,67E+03
PIS # 20				
1	2,53E+03	0,00E+00	2,21E+06	0,00E+00
2	7,70E+02	4,00E+01	3,22E+06	0,00E+00
3	3,85E+02	9,00E+01	1,05E+06	0,00E+00
4	NC	NC	4,15E+06	1,00E+03
5	3,50E+02	0,00E+00	4,00E+08	0,00E+00
6	1,60E+04	0,00E+00	3,05E+06	0,00E+00
7	3,30E+04	0,00E+00	1,63E+06	0,00E+00
8	4,20E+02	NC	1,59E+06	NC
9	1,75E+03	1,00E+01	3,52E+06	5,40E+03
10	4,70E+02	1,00E+01	1,30E+06	3,00E+03
11	4,30E+03	3,15E+02	3,92E+06	1,23E+04
12	1,56E+03	4,00E+01	4,51E+06	1,13E+04
13	8,00E+02	2,00E+01	1,48E+06	9,30E+03
14	3,85E+03	2,00E+01	6,40E+06	1,98E+04
15	2,00E+03	0,00E+00	4,84E+07	2,75E+03
16	4,95E+03	3,00E+02	3,84E+06	1,27E+04
17	3,25E+03	4,00E+01	5,98E+06	8,90E+04
PROMEDIO	4,77E+03	5,90E+01	2,92E+07	1,04E+04
INVERNADERO G-1				
1	3,43E+04	0,00E+00	9,52E+08	8,00E+04
2	3,03E+04	0,00E+00	1,75E+07	0,00E+00
3	6,45E+02	0,00E+00	1,70E+06	0,00E+00
4	7,70E+02	NC	2,40E+06	NC
5	4,35E+03	0,00E+00	3,63E+06	1,20E+03
6	1,80E+04	0,00E+00	1,00E+06	1,00E+02
7	NC	NC	4,85E+05	2,20E+03
8	2,30E+03	2,00E+01	3,77E+06	1,25E+03
9	2,93E+03	0,00E+00	4,70E+05	1,00E+03
10	5,90E+03	8,00E+01	1,18E+06	1,76E+04
11	2,26E+03	9,00E+01	5,08E+07	1,00E+02
12	2,85E+03	8,00E+01	4,65E+06	5,70E+03
13	5,76E+03	8,90E+02	2,26E+06	1,30E+04
14	3,90E+03	0,00E+00	4,60E+06	1,36E+04
15	4,93E+03	2,20E+02	3,39E+06	5,80E+03
16	1,63E+04	1,40E+02	4,86E+06	1,00E+02
17	5,35E+03	1,00E+02	3,53E+06	7,60E+03
PROMEDIO	8,80E+03	1,08E+02	6,22E+07	9,16E+03

Anexo 2 Porcentajes de los aislados Gram negativos y Gram positivos obtenidos durante los muestreos para las piscinas PIS #15-20 e Invernadero G-1.

PIS #15	AGUA%		SEDIMENTO%	
	GRAM+	GRAM-	GRAM+	GRAM-
1	0,0	100,0	62,5	37,5
2	0,0	100,0	50,0	50,0
3	0,0	100,0	25,0	75,0
4	50,0	50,0	30,0	70,0
5	50,0	50,0	66,7	33,3
6	16,7	83,3	14,3	85,7
7	0,0	100,0	14,3	85,7
8	50,0	50,0	42,9	57,1
9	16,7	83,3	30,0	70,0
10	66,7	33,3	57,1	42,9
11	0,0	100,0	14,3	85,7
12	11,1	88,9	40,0	60,0
13	0,0	100,0	33,3	66,7
14	0,0	100,0	18,	81,8
15	0,0	100,0	20,0	80,0
16	0,0	100,0	14,3	85,7
17	0,0	100,0	14,3	85,7
Promedio	15,4	84,6	32,2	67,8

PIS # 20	AGUA%		SEDIMENTO%	
	GRAM +	GRAM -	GRAM +	GRAM -
1	50	50	50	50
2	0	100	42,9	57,1
3	16,70	83,30	57,1	42,9
4	25	75	14,3	85,7
5	60	40	100	0
6	25	75	20	80
7	80	20	33,3	66,7
8	20	80	33,3	66,7
9	0	100	12,5	87,5
10	0	100	20	80
11	0	100	40	60
12	0	100	40	60
13	0	100	11,1	88,9
14	0	100	8,3	91,7
15	20	80	37,5	62,5
16	25	75	0	100
17	33,30	66,70	57,1	42,9
Promedio	20,9	79,1	34,0	66,0

Invernadero G-1	AGUA%		SEDIMENTO%	
	GRAM +	GRAM-	GRAM +	GRAM-
1	33,3	66,7	57,1	42,9
2	0,0	100,0	80,0	20,0
3	80,0	20,0	60,0	40,0
4	40,0	60,0	100,0	0,0
5	0,0	100,0	25,0	75,0
6	66,7	33,3	50,0	50,0
7	25,0	75,0	40,0	60,0
8	20,0	80,0	77,8	22,2
9	14,3	85,7	60,0	40,0
10	37,5	62,5	28,6	71,4
11	20,0	80,0	28,6	71,4
12	0,0	100,0	54,5	45,5
13	0,0	100,0	57,1	42,9
14	0,0	100,0	44,4	55,6
15	0,0	100,0	25	75
16	25	75	100	0,0
17	0,0	100,0	37,5	62,5
Promedio	21,3	78,7	54,5	45,6

Anexo 3 Parámetros abióticos registrados en las piscinas PIS #15-20 e Invernadero G-1 durante el estudio.

PIS #20				
# Muestreo	TEMPERATURA (°C)	SALINIDAD (g.L ⁻¹)	pH	OD (mg.L ⁻¹)
1	24,8	37	8,1	4,8
2	23,5	37	7,4	5,24
3	23,3	40	7,8	5,8
4	24,4	40	7,7	4,18
5	25,4	39	7,4	4,3
6	24,7	41	7,4	4,4
7	25,4	41	8,9	3,4
8	24,8	39	8	3,4
9	24,2	40	8,45	7
10	24,8	43	8,4	4,15
11	25	40	8,36	2,6
12	24	43	8,54	2,6
13	24,8	45	8,35	4,2
14	23,7	41	8,6	3,27
15	25,6	45	8,3	4,44
16	26,3	44	8,6	3,2
17	27,1	44	8,6	4,9

INVERNADERO G1				
# Muestreo	TEMPERATURA (°C)	SALINIDAD (g.L ⁻¹)	pH	OD (mg.L ⁻¹)
1	31	36	7,8	4,7
2	30,9	37	8	4,97
3	31,5	37	9,2	3,5
4	30,4	37	8,2	5,33
5	29,4	37	8,2	5,55
6	30,5	37	8,19	5,72
7	31,2	36	7,9	3,52
8	30,4	37	7,9	3,66
9	31,9	39	8	1,96
10	29,3	38	8	3,81
11	33,2	34	7,8	3,95
12	31,9	36	7,8	4,36
13	32,7	38	8	3
14	32,6	36	8	2,8
15	32,8	37	8	2,22
16	34	36	8	2,5
17	32,8	36	7,7	2,34

Anexo 4 Niveles de materia orgánica (mg.L⁻¹) en el agua registrados en las piscinas PIS #15-20 e Invernadero G-1 durante el estudio.

MO AGUA (mg.L ⁻¹)			
# Muestreo	Piscina 15	Piscina 20	Invernadero
1	50	67,5	257,9
2	55,8	53,2	63,4
3	63,7	62,2	75,7
4	68,9	65,4	93,5
5	76,7	103,8	81,3
6	61,9	80,1	77
7	83	82	85
8	73,3	98,3	75
9	67,4	77,8	108
10	56,8	63,2	106
11	62	69	116,8
12	59	62	104
13	47	55	115
14	70	76	129,8
15	54,4	83,2	102,7
16	56	98	104,7
17	65	101	100,5

Anexo 5 Porcentajes de materia orgánica en sedimento registrado durante el estudio en los sistemas de cultivos

MO SEDIMENTO (%)			
#Muestreo	Piscina 15	Piscina 20	Invernadero
1	5,35	4,26	4,1
2	7,89	3,68	4,1
3	6,99	6,45	5,0
4	8,06	3,30	4,2
5	5,76	4,32	2,0
96	8,12	5,35	2,0
7	7,14	4,74	1,5
8	3,16	5,64	5,0
9	4,17	6,95	2,1
10	4,71	5,38	5,6
11	7,73	6,38	4,6
12	3,72	5,79	5,1
13	7,89	2,65	4,1
14	5,91	2,88	4,6
15	6,99	3,11	4,6
16	3,91	6,84	3,0
17	5,24	5,67	6,1

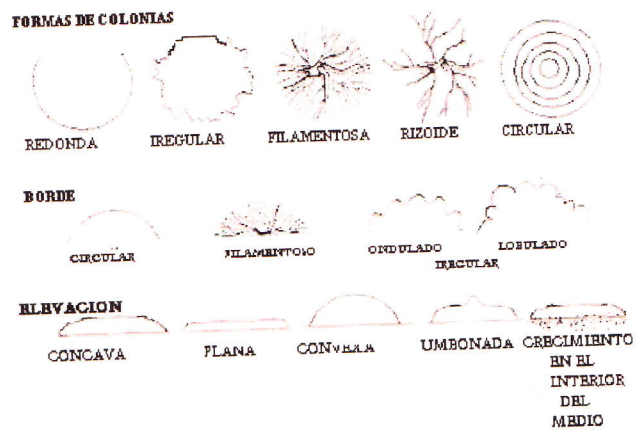
Anexo 6 Niveles de sólidos suspendidos totales registrados durante el estudio en los sistemas de cultivos.

SST (mg. L ⁻¹)			
# Muestreo	Piscina 15	Piscina 20	Invernadero
1	219,5	307,5	418,4
2	228	226	277,4
3	234,3	240,1	294,4
4	254,5	248,8	344,7
5	260,5	302,8	337,1
6	257	330,3	357,5
7	375,4	315,3	433,5
8	271,4	422,3	304
9	255,3	277,9	403
10	254,2	303,4	305
11	358,2	322,2	341,9
12	255	314	331,2
13	245	268	305
14	293	272	356,9
15	267,7	314,1	291,1
16	274,2	326,9	303,3
17	238	321	332,6

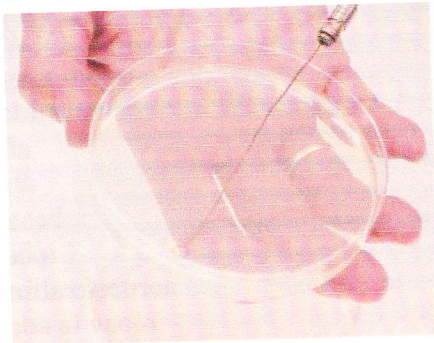
Anexo 7 Muestras recolectadas de agua y sedimento.



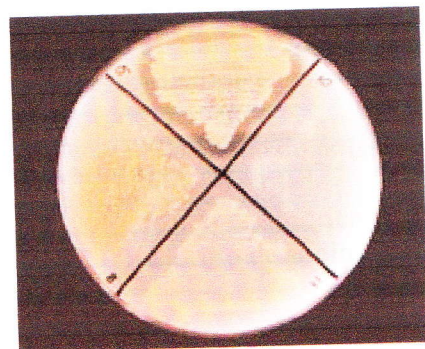
Anexo 8 Estructura morfológica que presentan las colonias bacterianas.



Anexo 9 a) Aislamiento y b) crecimiento bacteriano.



a) Aislamiento



b) Crecimiento

Anexo 10 Materiales, equipos y químicos utilizados

Materiales

Frasco de 500 ml de vidrio
Core de 5cm
Cajas petri
Asa de platino y vidrio
Tubos de ensayos
Pipetas
Microtubos de 1,5 ml
Fioles de 1000, 500, 250 ml
Papel parafilm
Mechero
Gradilla para tubos de ensayos
Fósforo
Palillos de Madera
Cajas de plástico para microtubos
Papel aluminio
Crisoles
Filtros G/C 42,5 mm de diámetro
Vaso de precipitación de 250 ml
Probetas de 1000, 500 y 10 ml
Pinzas

Equipos

Incubadora
Cámara biológica
Balanza
Refractómetro
Oxigenómetro
Peachimetro
Mufla
Estufa
Desecador
Secador
Hornilla eléctrica
Bomba al vacío

Químicos

Agar TCBS
Agar marino
Agar TSA
Medio TSB
Glicerol
Bactoagar
Hidróxido de potasio 3%
Agua destilada
Ácido clorhídrico
Cloruro de sodio

Anexo 11 Piscinas: sistema intensivo y semi - intensivo

